



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ

Calea Mănăstur 3-5, 400372, Cluj-Napoca
Tel: 0264-596384, Fax: 0264-593792
www.usamvcluj.ro



Inginer diplomat

Rodica FLUTUR

**Înmulțirea *in vitro* prin
micropropagare a nukului comun
(*Juglans regia* L.) și importanța
acesteia în
ameliorarea și cultura speciei**

Rezumat al tezei de doctorat

Conducători științifici:
Prof. Dr. Radu SESTRĂȘ
Prof. Dr. Kouros VAHDATI

Cluj-Napoca
2012

Cuprins

INTRODUCERE	3
CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	4
1.1 IMPORTANȚA ECONOMICĂ, ALIMENTARĂ ȘI CULTURALĂ A SPECIEI <i>JUGLANS REGIA L.</i>	4
1.1.1. <i>Importanța economică</i>	4
1.1.2. <i>Importanța alimentară</i>	4
1.1.3. <i>Importanța culturală</i>	5
1.2 ORIGINE ȘI ISTORIC	5
CAPITOLUL 2. ÎNMULȚIREA <i>IN VITRO</i> PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN <i>J. REGIA L.</i> ȘI IMPORTANȚA ACESTEIA ÎN CULTURA ȘI AMELIORAREA SPECIEI	7
2.1 STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎNMULȚIRII <i>IN VITRO</i> PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN (<i>J. REGIA L.</i>)	7
2.2 AVANTAJE ȘI DEZAVANTAJE ALE ÎNMULȚIRII <i>IN VITRO</i> PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN	9
2.3 IMPORTANȚA MICROPROPAGĂRII NUCULUI COMUN <i>J. REGIA L.</i> PENTRU AMELIORARE	11
CAPITOLUL 3. CADRUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR	12
3.1 PARTICULARITĂȚI ȘI ASPECTE ALE ZONEI UNDE S-A DESFĂȘURAT CERCETAREA	12
3.2 OBIECTIVE PROPUSE	14
CAPITOLUL 4. MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODA DE LUCRU	16
4.1 MATERIALUL BIOLOGIC	16
4.2 METODA DE LUCRU	16
4.2.1. <i>Prepararea mediului de cultură</i>	16
4.2.2. <i>Stabilizarea microbutașilor</i>	16
4.2.3. <i>Multiplacarea microlăstarilor</i>	17
4.2.4. <i>Înrădăcinarea microlăstarilor</i>	17
4.2.4.1 <i>Inducerea înrădăcinării</i>	17
4.2.4.2 <i>Înrădăcinarea propriu-zisă</i>	17
4.2.5. <i>Aclimatizarea în seră a plantelor</i>	18
CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII	19
5.1.1. <i>Rezultate privind influența genotipului și a agentului de gelifiere asupra lungimii microlăstarilor</i>	19
5.1.2. <i>Rezultate privind influența genotipului și a agentului de gelifiere alternativ asupra lungimii microlăstarilor</i>	21
5.2 ETAPA DE MULTIPLICARE <i>IN VITRO</i> A MICROLĂSTARILOR	23
5.2.1. <i>Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra numărului de microlăstari</i> 23	23
5.2.2. <i>Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra înălțimii microlăstarilor</i> 25	25
5.2.3. <i>Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra numărului de frunze/microlăstar</i>	26
5.2.4. <i>Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra lungimii frunzelor/microlăstari</i>	28
5.3 ETAPA DE ÎNRĂDĂCINARE <i>IN VITRO</i> A PLANTELOR DE NUC	30
5.3.1. <i>Importanța temperaturii, carbohidraților, auxinei și a perioadei de inducție pentru inducerea înrădăcinării plantelor de nuc</i>	30
5.3.2. <i>Rezultate privind influența genotipului asupra înrădăcinării propriu-zise a plantelor de nuc</i>	30
5.4 ETAPA DE ACLIMATIZARE ÎN SERĂ A PLANTELOR DE NUC	33
5.5 TRANSFERUL PLANTELOR DE NUC ÎN CÂMP DESCHIS	37
CAPITOLUL 6. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI	39
BIBLIOGRAFIE	41

INTRODUCTION.....47
PROPOSED OBJECTIVES.....48
CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS48

INTRODUCERE

Teza de doctorat cu titlul „Înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului comun (*J. regia L.*) și importanța acesteia în ameliorarea și cultura speciei” are ca și obiectiv principal îmbogățirea cunoștințelor legate de înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului comun care există la ora actuală în România și evidențierea importanței pentru ameliorare a nukului obținut prin această metodă.

Motivația alegerii acestei teme se datorează dorinței mele de a cunoaște mai bine această specie valoroasă din punct de vedere economic și cultural.

Înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului comun este o metodă complexă prin ansamblul de etape ce trebuie parcurse în laborator, respectiv: inițierea culturilor, stabilizarea culturilor, multiplicarea și înrădăcinarea plantelor. Complexitatea acestei metode nu constă doar în gradul de dificultate a executării acestor operații, ci în special în sensibilitatea care o prezintă explantele de nuc introduse în mediul *in vitro*.

În cadrul acestui studiu, pentru înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului comun, am folosit microbutași proveniți de la trei soiuri (Chandler, Franquette și Jupânești).

Mediul de cultură DKW (Driver, 1986) a fost folosit în etapa de stabilizare și multiplicare a culturilor, iar în etapa de inducere a înrădăcinării am folosit mediu MS (Murashige și Skoog).

În etapa de stabilizare a microbutașilor s-au folosit trei agenți de gelifiere diferiți (2,1 g/l Phytigel, 2,2 g/l Gelrite și 10 g/l agar), auxină (0,1 mg/l AIB), citochinină (1 mg/l BAP) și 3 % zahăr.

Pentru multiplicarea culturilor am folosit trei concentrații diferite de BAP (0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,2 mg/l).

Pentru inducerea înrădăcinării am folosit AIB în concentrație de 3 mg/l iar plantele au fost ținute la întuneric timp de 8 zile.

La înrădăcinarea propriu-zisă a plantelor de nuc am folosit vermiculita oferită de societatea „Comptoir de Minéraux et Matières Premières” din Franța, iar produsul Steckmedium l-am folosit la aclimatizarea plantelor de nuc în seră și mi-a fost oferit de către compania „Klasmann Deilmann” din Germania.

În cadrul acestei teze de doctorat am efectuat și un studiu preliminar legat de influența unor agenți de gelifiere alternativi (făina de cassava și tapioca) asupra stabilizării culturilor de nuc. Acest tip de agenți de gelifiere sunt utilizați în prezent cu succes în micropropagarea altor specii. Materialele pentru acest studiu le-am obținut de la Dr. Vandana Kumar, profesor în cadrul Colegiului de Silvicultură și Agricultură din India și a Prof. Sylvestre K. Bakoh, din Yaounde, Camerun.

CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1 IMPORTANȚA ECONOMICĂ, ALIMENTARĂ ȘI CULTURALĂ A SPECIEI *JUGLANS REGIA L.*

Nucul, considerat una din cele mai vechi specii pomicele, este important atât din punct de vedere economic și alimentar, datorită calității fructelor sale, a calității superioare a lemnului și a celorlalte organe ale sale, cât și din punct de vedere cultural.

1.1.1. Importanța economică

Nucul comun (*J.regia L.*) este o plantă care nu necesită lucrări agrotehnice ce implică costuri operaționale mari de-alungul unui an calendaristic.

Pentru a avea o cultură rentabilă de nuc este necesară obținerea unei producții de cel puțin 2000 de kg/ha de nuci, iar pentru a putea fi realizate investiții din profitul obținut este recomandat să se poată obține o producție cuprinsă între 3500- 4500kg/ha de nuci.

Dimensiunea economică a plantației de nuc, a fost studiată și de alți autori, precum (Kurtz and Garrett, 1990) în lucrarea „Economic aspects of eastern black walnut management”.

Prin acest studiu Kurtz dezvoltă teoria creșterii productivității pe unitatea de suprafață prin realizarea unei asocieri între cultura de nuci și alte culturi agricole intercalate (soia). Cicek (Cicek, Akcay, 2001) a subliniat importanța intercalării plantației de soia pentru minimizarea efectelor negative determinate de nefructificarea anuală a nucului.

La nivel internațional (Siebert, 1993) industria producătoare de fructe este controlată prin normele elaborate de Comunitatea Europeană și Statele Unite.

La nivel european, industria producătoare de fructe, funcționează conform prevederilor Tratatului de la Roma, semnat la 25 martie 1957 de către BENELUX, Franța, Germania și Italia, de creare a unei piețe comune care limitează granițele comerțului, adresându-se statelor membre.

1.1.2. Importanța alimentară

Din punct de vedere alimentar nucile reprezintă un aliment complet și concentrat prin conținutul de substanțe grase, substanțe proteice, hidrați de carbon, substanțe minerale, vitamine.

În stare proaspătă (Cociu, Achim, 2003) fructul conține: 17,57% apă, 11,05% materii azotoase, 41,58% materii grase, 26,5% materii extractive, 1,3% celuloză, 1,6% cenuși.

Valoarea energetică a unui kilogram de miez de nucă este echivalentă cu: un kilogram de pâine + 0,5 kg de carne + 0,5 kg de pește + 0,5 kg de prune uscate + 1 kg de pere, asigurând 6364 calorii.

Ținând cont de compoziția sa, nuca este un produs alimentar care are efecte benefice asupra sănătății consumatorilor datorită conținutului bogat în acizi grași polinesaturați. Acidul linoleic (60%) și acidul linolenic (12%) au efecte de prevenire a apariției cancerului și a bolilor cardiovasculare (Germain, Prunet, 1999).

Acidul linoleic și acidul linolenic în combinație cu vitamina B6 (prezentă de asemenea în miezul de nucă) formează acidul arahidonic. Acidul arahidonic și acidul linoleic au proprietatea de a spori elasticitatea și de a micșora permeabilitatea vaselor sanguine, de a forma cu colesterolul compuși ușor solubili, grăbind transformarea în ficat a colesterolului în acizi biliari, contribuind astfel la eliminarea colesterolului din organism.

Miezul de nucă conține, de asemenea, proteine (16%), glucide (12%), fibre, elemente minerale (potasiu, fosfor, fier și calciu) și de asemenea, vitaminele A, B, C și tocoferoli (vitamina E) cu efect pozitiv în protejarea sănătății omului (intervine în metabolismul grăsimilor, al calciului și al fosforului, ca și în sinteza proteinelor, limitează producerea de colesterol; controlează eliminarea apei din organism, previne îmbătrânirea celulelor, previne apariția aterosclerozei; fortifică musculatura, capacitatea mintală; acționează pozitiv asupra circulației sanguine și asupra regenerării pielii

1.1.3. Importanța culturală

În Roma antică, în cadrul ceremoniilor de nuntă, nucile erau aruncate de către mire, având simbolul maturității și al fertilității miresei.

În evulul mediu, nucile erau folosite în scopul scăderii greutății, împotriva febrei, a farmecelor și a stărilor de epilepsie.

Conform „Doctrinei semnăturilor” (suntem ceea ce mâncăm), o filosofie elaborată de mai mulți botaniști din perioada lui Pedanius Dioscorides, farmacist, fizician și botanist grec, tincturile din coajă de nuci erau utilizate ca și tratament pentru scalp, iar miezul de nucă pentru dezvoltarea inteligenței.

1.2 ORIGINE ȘI ISTORIC

O relatare istorică din Persia, din anul 2000 î. Cr., (actuala Republică Islamică Iran) arată că fructul era consumat doar de către regalitate, de unde și denumirea de “nuc regal” păstrată până astăzi.

Din Iran, nucul s-a răspândit în Mesopotamia (actualul stat Irak, parțial Siria și parțial Turcia) în timpul dominației Imperiului Babilonian.

Hammurabi, al 6-lea rege al Babilonului în perioada 1728 î.H.- 1686 î. H., a scris un cod de legi, cunoscute sub denumirea de “Codul lui Hammurabi” în care menționează nucile ca aliment în lista produselor alimentare.

Tăblițele caldeene menționează prezența plantațiilor de nuci în grădinile suspendate ale Babilonului, Dinastia Caldeeană fiind a 11-a dinastie a Babilonului în perioada 604 î.H.- 562 î.H..

Nucul este amintit și în Vechiul Testament, în cartea „Cântarea cântărilor ” scrisă de Solomon, împăratul statului Israel în perioada 971 î.Hr.- 931 î.Hr. care spune: „M-am pogorât în grădina cu nuci...”.

După persani, grecii au fost cei care și-au adus o contribuție foarte importantă la răspândirea și îmbunătățirea nucului comun în lume.

În mitologia greacă, Carya („karya” = “arbore de nuc”) fiica lui Dion regele Laconiei a fost prefăcută în arbore de nuc de către Dionysos fiul lui Zeus.

Din Grecia, nucul comun s-a răspândit apoi în Roma antică, locul de unde a plecat și denumirea de „Jovis glans” (lb. lat. „Jovis” = Jupiter, considerat zeitatea supremă a statului roman, având ca și responsabilități legile și ordinea socială și „glans” = ghindă).

Din Italia, nucul comun s-a răspândit în Franța, Spania, Portugalia și sudul Germaniei. Această specie a apărut în Anglia după anul 1562, iar în Statele Unite ale Americii a fost adusă de primii coloniști. Coloniștii americani i-au dat denumirea de „English walnut” (nucul englez) pentru a-l distinge de nucul negru american „Black walnut”.

În România, nucul este cunoscut și sub denumirea de „nuc carpatic”.

Cu peste 2000 de ani în urmă, poetul roman Ovidiu, exilat la Tomis scria despre nuc că este „puțin pretențios, el crește chiar pe marginea drumurilor și nu se teme de nimic, nici de vânturi, nici de tunet, nici de ploaie, nici de arșiță” (Cociu, Botu, 2007).

Domnitorul Țării Românești, Dan I, într-un document din anul 1385, amintește de „nucii de la Dăbăcești, pe râul Jaleșului, dăruți Tismanei”, iar actul lui Mircea cel Bătrân de la 1837 amintește de „livezile cu nuci” (Cociu, Botu, 2007).

Nicoleanu și Brezeanu (1900) arată că, între anii 1883- 1885, două societăți străine au cumpărat mii de rădăcini și trunchiuri de nuc din județul Gorj. În anul 1905 nucii cultivați se regăseau numai în județele din Muntenia și Moldova (peste 1.009.046 de nucii) (Cociu, Botu, 2007).

Începând din anii 1976- 1980, nucul a început să se extindă treptat în România, mai întâi în gospodăriile individuale, unde se obținea din sămânță, urmând ca, mai apoi prin anii 1981 să se înființeze primele plantații de nuc altoit. Primele plantații astfel înființate au fost cele din județele: Bihor, Gorj, Iași, Dolj, Constanța.

În anul 1958 la S.C.P.P. Geoagiu, N. Meza și V.Cociu au efectuat primele cercetări în scopul obținerii unor soiuri autohtone de nuc, ajungându-se la un număr de 18 soiuri de nuc omologate.

În perioada 1967-2007 s-au creat 27 de soiuri de nuc (Botu, 2008) din care: 10 soiuri de nuc au fost obținute la S.C.D.P. Geoagiu, 6 soiuri de nuc la I.C.D.P. Pitești, 4 soiuri de nuc la S.C.D.P. Tg. Jiu, 4 soiuri de nuc la S.C.D.P. Iași și 3 soiuri de nuc la S.C.D.P. Râmnicu Vâlcea.

CAPITOLUL 2. ÎNMULȚIREA *IN VITRO* PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN *J. REGIA L.* ȘI IMPORTANȚA ACESTEIA ÎN CULTURA ȘI AMELIORAREA SPECIEI

Înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului comun (*J. regia L.*) are o importanță considerabilă pentru agricultură, horticultură și silvicultură deoarece furnizează material uniform, productiv și realizează înmulțirea plantelor elită folosite în scopuri alimentare și ornamentale, a legumelor și a arborilor forestieri.

Ca o alternativă la metodele tradiționale ale macropropagării bazate pe o muncă intensivă și pe o productivitate limitată, s-a dezvoltat micropropagarea.

Metodele utilizate în micropropagare se bazează pe producerea de țesut steril, stimularea regenerării, creșterea rapidă a plantelor tinere și adaptarea la condițiile de sol (Collin and Edwards, 1998).

2.1 STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎNMULȚIRII *IN VITRO* PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN (*J. REGIA L.*)

Micropropagarea este un instrument de lucru important în multiplicarea genotipurilor de nuc.

În anul 1962, T. Murashige și F. Skoog au creat un mediu de cultură, denumit ulterior MS, cu scopul favorizării creșterii rapide a culturilor de țesut de tutun (Murashige and Skoog, 1962). Acest mediu de cultură se folosește cu succes la înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nukului.

Primele rapoarte privind micropropagarea nukului au apărut în literatura de specialitate în perioada 1980 - 1984.

În anul 1984, Driver și Kuniyuki (Driver, Kuniyuki, 1981) au studiat înmulțirea *in vitro* a portaltoiului Paradox (*J. hindsii* x *J. regia L.*). Prin acest studiu s-a urmărit dezvoltarea unor tehnici de culturi de țesuturi pentru regenerarea plantelor de Paradox cu scopul înmulțirii clonelor superioare. În urma cercetărilor efectuate, aceștia au demonstrat fezabilitatea realizării de culturi de țesuturi pe mediu de cultură, denumit ulterior mediu DKW, pentru înmulțirea în masă a portaltoiului Paradox.

În anul 1987, R. Gruselle (Gruselle, Badia, 1987) a cercetat posibilitatea înmulțirii *in vitro* a nukului prin intermediul microbutașilor recoltați de pe puietii de 6- 12 luni. În urma realizării experimentelor, s-a observat o rată de înrădăcinare destul de mică a explantelor.

În anul 1989, D. Cornu (Cornu and Jay Allemand, 1989) au realizat un studiu asupra înmulțirii *in vitro* a hibridilor (*J. nigra* x *J. regia L.*) prin cultura și multiplicarea embrionilor. Pe același tip de mediu de cultură folosit, au observat o variabilitate mare în dezvoltarea mugurilor și alungirea lăstarilor. Cauzele variabilității, în opinia celor doi cercetători, s-au datorat: compoziției mediului de cultură, ratei difuziei moleculare sau metabolismului compușilor fenolici.

În anul 1990, R. Gruselle și P. Boxus (Gruselle and Boxus, 1990) au reluat cercetările în vederea înmulțirii *in vitro* a unor specii diferite de Juglans: *J. regia L.*, *J. nigra*, *J. cinerea*

și portaltoiul Paradox. La fel ca și în primele cercetări (1987) s-a observat o variabilitate destul de mare între repetiții.

În anul 1992, J. Allemand (Jayallemand, Capelli, 1992) au obținut o rată de înrădăcinare bună a hibridilor (*J. nigra* x *J. regia* L.), prin introducerea vermiculitei în compoziția mediului de cultură DKW îmbunătățit.

În anul 1993, R Tarrazo (Rguez. Tarrazo, Ignacio de Sebastian, 1993) a efectuat o serie de cercetări în scopul determinării modalității de influență a fazelor fenologice ale mugurilor de nuc asupra procesului de inițiere *in vitro*.

În același an, 1993, s-au efectuat o serie de cercetări asupra factorilor care influențează gradul de înrădăcinare a culturilor de nuc.

Astfel, Jay Allemand (JayAllemand, Peng, 1993) a analizat influența îndepărtării mugurilor de pe lăstarii *in vitro*, influența polifenolilor și a vermiculitei asupra creșterii și înrădăcinării unor culturi de hibridi.

Berros (Berros, Astorga, 1993), respectiv Rodrigues (Rodriguez, Lopez, 1993) au efectuat mai multe tipuri de tratamente, în funcție de vârsta explantului, pentru stimularea înrădăcinării culturii inițiate *in vitro*.

D. Sanjuan (DolcetSanjuan, Claveria, 1996) au încercat să îmbunătățească gradul de aclimatizare a plantelor în seră, prin inocularea unor micorize (*Glomus mosseae* și *Glomus intraradices*).

Silva et all. (Marques Silva and Dias, 1997) au determinat importanța carbohidraților asupra creșterii numărului și mărimii lăstarilor obținuți *in vitro*.

Tot în același an, Rios (Rios, Sanchez-Olate, 1997) au efectuat cercetări cu privire la parametrii care afectează creșterea și înrădăcinarea culturilor *in vitro* de *J. regia* L..

O serie de cercetători de la Școala Superioară Agricolă din Santarem au urmărit să evedențieze îmbunătățirea calității plantelor de nuc printr-o înmulțire eficientă *in vitro*, afirmând că, nivelul de calitate a plantelor înmulțite *in vitro*, depinde de modalitatea de întreținere a plantelor mamă în condiții controlate de mediu, de hormonii utilizați precum și de fazele fiziologice ale materialului colectat.

Rezultatele cercetărilor efectuate de către Rai (Rai, 2001) au indicat faptul că, micorizele au un “impact pozitiv” asupra transplantării plantelor obținute prin înmulțire *in vitro*.

Navatel și Bourrain (Navatel and Bourrain, 2001) au efectuat cercetări asupra producției de plante de *J. regia* L. obținute prin înmulțire *in vitro*, menționând faptul că, un proces de micropropagare bine efectuat conduce la obținerea unor plante numeroase și foarte omogene. Materialul biologic folosit în procesul de înrădăcinare și aclimatizare a fost format din trei portaltoi viguroși de *J. regia* L. și trei cultivare de *J. regia* L. („Lara”, „Chandler” și „Franquette”).

Saadat și Hennerty (Saadat and Hennerty, 2001) au efectuat mai multe experimente pentru a determina efectul tratamentelor cu auxine (acid naftalenacetic și acid indolil butiric) asupra înrădăcinării microbutașilor de *J. regia* L..

Zamani (Zamani and Vahdati, 2001) a cercetat influența carbohidraților și a tratamentelor cu azot asupra creșterii lăstarilor de *J. regia* L. și asupra aspectului lor.

Tetsumura (Tetsumura, Tsukuda, 2002) a efectuat cercetări asupra procesului de înrădăcinare *in vitro*, a unor varietăți de locale de *J. regia* L., prin folosirea de hormoni de creștere și vermiculită. Rezultatele obținute le-au confirmat pe cele obținute de JayAllemand (Jayallemand, Capelli, 1992).

Lopez (Lopez, 2004) a efectuat o serie de cercetări și aplicații practice referitoare la culturile de țesut ale plantelor de *J. regia* L., menționând câteva aspecte legate de importanța cultivării plantelor obținute prin micropropagare.

Vahdati (Vahdati, Leslie, 2004) a examinat modul de înrădăcinare *in vitro* a trei cultivare comerciale de nuc („Sundland”, „Chandler”, „Vina”). Înrădăcinarea a fost optimă după ce microlăstarii au fost ținuti între 6 și 8 zile pe mediul de inducere a înrădăcinării.

Problema principală a micropropagării nukului comun, sesizată de Leal (Leal, Sánchez-Olate, 2007), este cea a contaminării explantelor inițiale. De asemenea, oxidarea țesuturilor pe parcursul sterilizării superficiale a explantelor conduce la o scădere a numărului de microbutași obținuți.

Caboni (Caboni and Damiano, 2006) a identificat câțiva factori critici ai înmulțirii *in vitro* a nukului și anume: compoziția mediului de cultură (mediu DKW cu conținut redus de săruri), păstrarea culturilor la întuneric timp de 10- 12 zile concomitent cu adăugarea unui hormon de creștere, transferul microbutașilor, după faza de inițiere, pe un mediu fără hormoni, în absența bacteriei *Agrobacterium rhizogenes*. Folosirea bacteriei *A. Rhizogenes* a condus la creșterea procentului de înrădăcinare, chiar și în absența tratamentului cu auxine.

Hacketta (Hacketta, Leslieb, 2009) a efectuat o serie de cercetări referitoare la aclimatizarea plantelor de nuc înmulțite *in vitro*.

Bourrain (Bourrain, 2009) a efectuat o serie de cercetări referitoare la fazele micropropagării nukului comun și la impactul folosirii micorizelor.

Rezultatele înmulțirii prin micropropagare a unor genotipuri pitice de nuc au demonstrat consecvența unei vigori scăzute, precocitatea și înrădăcinarea ușoară a acestora (Sharifian, Vahdati, 2009).

2.2 AVANTAJE ȘI DEZAVANTAJE ALE ÎNMULȚIRII *IN VITRO* PRIN MICROPROPAGARE A NUCULUI COMUN

În urma derulării activităților de înmulțire *in vitro* prin micropropagare a nukului comun se pot desprinde o serie de avantaje și dezavantaje legate de aspectele științifice, economice și ecobiologice ale speciei.

Avantajele înmulțirii *in vitro* prin micropropagare a nukului comun sunt:

- randamentul obținut la plantele înrădăcinate pe rădăcini proprii este mult mai mare decât la plantele altoite. Hasey (Hasey, Westerdahl, 2001) a observat că soiul “Chandler” înrădăcinat pe rădăcini proprii a fost mult mai viguros (randamentul cumulat pe 5 ani a fost de trei ori mai mare) decât soiul “Chandler” altoit pe portaltoi “Paradox”, randamentul cumulat pe o perioadă de cinci ani);
- plantele înrădăcinate pe rădăcini proprii sunt mult mai rezistente la atacul nematodelor decât plantele altoite afectate de leziuni la nivelul rădăcinilor; (Hasey J., Westerdahl,

- 1999) a observat o vigoare foarte ridicată a soiului “Chandler” înrădăcinat pe rădăcini proprii la atacul unei populații puternice de nematode; de asemenea, portaltoii “Paradox” au prezentat o toleranță mult mai mare, la atacul nematodelor, decât portaltoii de *J. hindsii* și o lipsă totală a cancerului bacterian produs de *Agrobacterium tumefaciens*;
- vigoare foarte bună a soiurilor înrădăcinate pe rădăcini proprii la condițiile dificile de creștere (înălțimea de creștere în anul al doilea de la plantare a unor soiuri viguroase de *J. regia* L.: “Sunland”, “Serr” a depășit 3.5 m; fructificare foarte precoce; primele flori femele au apărut în anul al doilea de la plantare, iar primele flori masculine s-au evidențiat abia în anul al șaselea de la plantare (Lopez, 2001) și (Frutos Tomas, 2003).
 - nivel ridicat de omogenitate a plantației prin clonarea portaltoilor aparținând aceluiași soi (mai mult de 20 de clone înrădăcinate pe rădăcini proprii și aparținând aceluiași soi au fost mai performante decât soiul inițial și mai ușor adaptabile la condițiile de sol (Lopez, 2001). Portaltoii viguroși au rol în creșterea productivității. Această caracteristică este importantă pentru amelioratori care urmăresc utilizarea de altoi foarte viguroși altoiți ulterior pe portaltoi cu capacități de creștere heterogene și necunoscute;
 - spre deosebire de arborii altoiți care au o rădăcină pivotantă, arhitectura rădăcinilor la arborii înrădăcinați pe rădăcini proprii este fibroasă ceea ce favorizează o absorbție foarte bună a apei și a nutrienților, o bună ancorare a arborilor în sol; au fost identificate 20 de rădăcini primare toate provenind direct din colet (Lopez, 2001).
 - lipsa punctului de altoire îmbunătățește procesul de creștere al arborilor, Prunet și Ginibre (Prunet and Ginibre, 2000) înregistrând o vigoare mult mai mare a soiului “Lara” obținut pe rădăcini proprii decât a soiului “Lara” altoit pe portaltoi foarte viguros de *J. regia* L. obținut prin înmulțire *in vitro*;
 - înmulțirea *in vitro* prin micropropagare este o metodă fiabilă în realizarea unei selecții bune a portaltoiului prin posibilitatea realizării de repetiții suficiente care să fie testate în câmp, în condiții diferite;
 - obținerea unui material lemnos de calitate prin lipsa punctului de altoire;
 - întreaga activitate de laborator aproape 100% controlate.

Dezavantaje care apar la înmulțirea *in vitro* prin micropropagare a nucului comun:

- comparativ cu alte metode de înmulțire vegetativă, comportamentul culturilor de țesut înmulțite prin micropropagare diferă foarte mult de la o specie la alta;
- pentru obținerea aceluiași număr de plante este necesară uneori desfășurarea unor etape mai lungi și mai multe ale înmulțirii prin micropropagare ceea ce implică: creșterea numărului personalului și implicit a costurilor de producție;
- necesitatea amenajării unui spațiu de lucru care să asigure desfășurarea procesului de micropropagare în condiții aseptice, precum și asigurarea permanentă cu materiale consumabile;
- nivel de specializare și de cercetare ridicat al personalului participant la activitățile de obținere a plantelor prin micropropagare.

2.3 IMPORTANȚA MICROPROPAGĂRII NUCULUI COMUN *J. REGIA* L. PENTRU AMELIORARE

Între micropropagare și ameliorarea plantelor există o relație de interdependență care are următoarele obiective:

- obținerea de clone superioare prin stabilizarea unor factori de stres: obținerea de portaltoi rezistenți la stresul hidric și la atacul unor boli și dăunători frecvent întâlniți în cultură: boala liniei negre provocată de virusul *Cherry leafroll* (CRLV), putrezirea coletului și a rădăcinilor în urma atacului de *Phytophthora cinnamomi* și *Armillaria mellea*, cancerul bacterian provocat de către *Agrobacterium tumefaciens* și nematode care distrug sistemul radicular;
- tehnica *in vitro* de manipulare a materialului biologic poate fi folosită ca și modalitate de conservare a germoplasmei în băncile de gene;
- prin intermediul ingineriei genetice se pot obține plante valoroase, rezistente la condițiile de stres (de exemplu adaptabilitatea plantelor pe solurile sărăturate);
- clonele homozigote obținute prin înmulțirea *in vitro* vor putea fi folosite în cadrul proceselor de ameliorare la obținerea de hibrizi F₁;
- obținerea de soiuri cu caractere fenologice valoroase: perioada de înfrunzire, înflorirea și recoltarea (data recoltării), precocitatea, tipul de fructificare, randamentul estimat, îmbunătățirea caracteristicilor fizice (forma, textura, finețea, duritate, greutatea miezului, procentul de miez, culoarea, gradul de umplere, ușurința îndepărtării miezului din coajă).
- obținerea de avantaje economice prin îmbunătățirea unor caractere valoroase și anume: precocitatea, fructificarea laterală, perioada timpurie de recoltare;
- introducerea în cultură de polenizatori valoroși care să îmbunătățească fondul genetic disponibil pentru ameliorare;
- evaluarea descendenților obținuți din încrucișările realizate anterior în funcție de: data înfrunziturii, receptivitatea florilor femele, dehiscența anterelor, randamentul, gradul de fructificare laterală, caracteristicile fructelor;
- obținerea de plante care să conducă la reducerea costurilor pe care le implică industria nucului.

CAPITOLUL 3. CADRUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

3.1 PARTICULARITĂȚI ȘI ASPECTE ALE ZONEI UNDE S-A DESFĂȘURAT CERCETAREA

Cercetările privind micropropagarea nucului comun (*J. regia* L.) s-au desfășurat la Colegiul Abouraihan, din orașul Pakdasht, în laboratorul de biotehnologii al Facultății de Horticultură.

Iranul (semnifică “teren de aur”), țară recunoscută oficial ca Republica Islamică Iran, este situată în partea de sud-vest a Asiei (Orientul Mijlociu), între coasta nord-estică a Golfului Persic și coasta sudică a Mării Caspice.

Din punctul de vedere al temperaturilor medii lunare din România și din Iran, conform informațiilor furnizate de Climate Change Knowledge Portal (sdwebx.worldbank.org), datele înregistrate în perioada 1990 – 2009 sunt prezentate sistematic în tabelul de mai jos.

Tabelul 1/Table 1

Temperaturi medii lunare în România și Iran în perioada 1990 – 2009

Average montly temperatures in period 1990 - 2009

Luna /Month	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Temperaturile medii lunare(Iran)/	6.4	11.2	17	23.4	27.4	29.1	28.4	24.8	18.3	13.4	7.4	5.7
Temperaturi medii lunare (România)/	3	7.6	9.9	14.6	17.9	19.9	19.9	13.9	10.5	6.4	0.1	-1.8

Din datele prezentate în tabelul 17 se poate observa că, în perioada 1990 – 2009, la nivelul Iranului, cele mai mici temperaturi medii lunare s-au înregistrat în luna decembrie, respectiv 5,7°C, iar cele mai mari temperaturi medii lunare s-au înregistrat în luna iunie, respectiv 29,1°C.

La nivelul României, în perioada 1990 – 2009, cele mai mici temperaturi medii lunare s-au înregistrat în luna decembrie, respectiv -1,8°C, iar cele mai mari temperaturi medii lunare s-au înregistrat în lunile iunie și iulie, respectiv 19,9°C.

În perioada 1990 – 2009, între temperaturile medii lunare din România și temperaturile medii lunare din Iran s-au înregistrat diferențe cuprinse între 8 – 10°C.

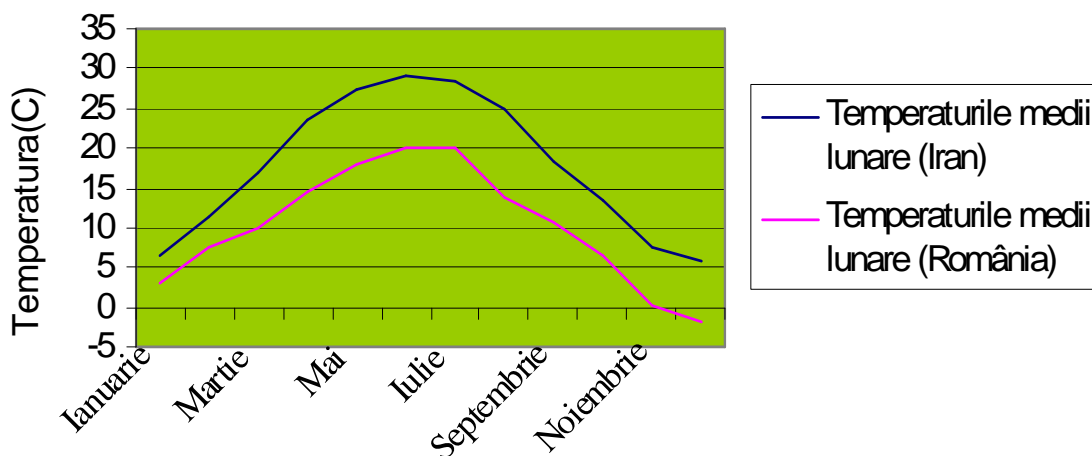


Fig. 1. Temperaturi medii lunare în România și Iran în perioada 1990 - 2009

Fig. 1. *Average montly temperatures in period 1990 - 2009*

Din graficul prezentat mai sus, se observă că, atât în România cât și în Iran, temperaturile medii lunare maxime s-au înregistrat în luna iunie, iar temperaturile medii lunare minime s-au înregistrat în luna decembrie.

Din punctul de vedere al precipitațiilor medii lunare din România și din Iran, conform informațiilor furnizate de Climate Change Knowledge Portal (sdwebx.worldbank.org), datele înregistrate în perioada 1990 – 2009 sunt prezentate sistematic în tabelul 18.

Tabelul 2/*Table 2*

Temperaturi medii lunare în România și Iran în perioada 1990 – 2009

Average montly temperatures in period 1990 - 2009

Luna /Month	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Precipitațiile medii lunare(Iran)	38.7	21	27..5	8.9	3.2	3.8	2.9	2.3	8.8	8	17.8	42.8
Precipitațiile medii lunare(România)	28	17.4	53	55.1	67.9	49.9	27.9	35.6	35.4	23.1	57.7	12.2

Din datele prezentate în tabelul 18 se poate observa că, în perioada 1990 – 2009, la nivelul Iranului, cele mai scăzute precipitații medii lunare s-au înregistrat în lunile iulie și august, respectiv 2,9 mm și 2,3 mm, iar cele mai multe precipitații medii lunare s-au înregistrat în luna decembrie, respectiv 42,8 mm.

La nivelul României, în perioada 1990 – 2009, cele mai scăzute precipitații medii lunare s-au înregistrat în luna decembrie, respectiv 12,2 mm, iar cele mai multe precipitații medii lunare s-au înregistrat în luna mai, respectiv 67,9 mm.

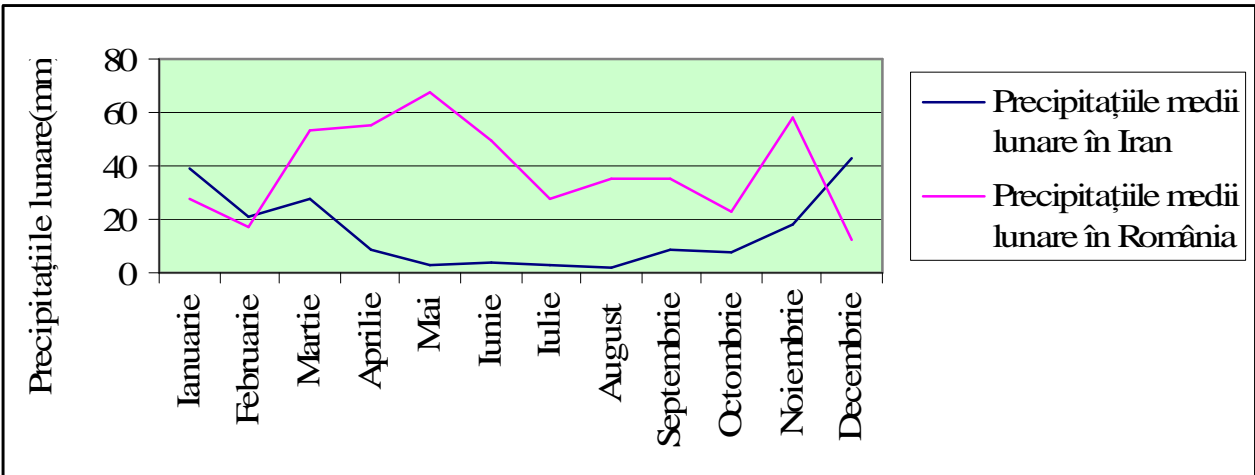


Fig. 2. Precipitațiile medii lunare în Iran și în România în perioada 1990 - 2009
 Fig. 2. Average monthly precipitations in Iran and Romania in period 1990 – 2009

Din graficul prezentat mai sus se observă că, din punctul de vedere al precipitațiilor medii lunare, între România și Iran se înregistrează diferențe majore. Dacă, în luna mai cantitatea de precipitații medii lunare din România a atins nivelul maxim, în Iran cantitatea de precipitații medii lunare a înregistrat cel mai scăzut nivel.

În perioada 1990 – 2009, respectiv în lunile ianuarie – februarie cantitatea de precipitații medii lunare a înregistrat valori apropiate la nivelul României și Iranului.

Colegiul Abouraihan este localizat în partea de nord a orașului Pakdasht, având o suprafață de 30 ha, inclusive 8 ha cu ferme de cercetare.

În anul 1952 (anul iranian 1331), Colegiul Abouraihan și-a început activitatea, iar din anul 1966, respectiv anul iranian 1345 se desfășoară învățământul în grad universitar de licență.

3.2 OBIECTIVE PROPUSE

Obiectivul general al cercetării îl reprezintă perfecționarea tehnicilor cunoscute, de înmulțire prin micropropagare și adaptarea protocoalelor existente la genotipurile din sortimentul internațional și național.

Aceste metode sunt destul de puțin folosite de către instituțiile de cercetare din țară, sau sunt folosite dar fără rezultate eficiente comparativ cu progresele realizate în acest domeniu de către instituții de cercetare internaționale.

Obiectivele specifice ale cercetării sunt:

- selecția, pentru înmulțirea prin micropropagare, a unor soiuri de nuc productive sau selecții locale, ușor adaptabile la condițiile de sol, climă și rezistente la atacul bolilor și dăunătorilor;
- stabilizarea compușilor fenolici eliminați ca urmare a intervențiilor efectuate asupra materialului vegetal folosit pentru înmulțire;
- realizarea unei rate de înmulțire a plantelor cât mai bună;

- producerea de plante noi, libere de boli;
- aclimatizarea bună a plantelor pentru a putea obține culturi de viitor;
- obținerea unor plante de calitate ce vor constitui bază de plecare în procesul de ameliorare.
- obținerea unor rezultate viabile care să reprezinte un punct de referință pentru cercetările viitoare și pentru specialiștii din domeniul pepinieristic.

CAPITOLUL 4. MATERIALUL BIOLOGIC ȘI METODA DE LUCRU

4.1 MATERIALUL BIOLOGIC

Un rol important în reușita inițierii culturilor *in vitro* îl are sezonul, iar legat de aceasta, fenofaza în care se află organele donatoare de explante. Factorii endogeni joacă un rol predominant în conservarea viabilității și a totipotentialității celulelor țesuturilor explantate. Astfel, cu toate că inițierea unei culturi *in vitro* poate fi realizată pe parcursul întregului an, intensitatea diferențierii este variabilă în funcție de sezon, de concentrația sezonieră în hormoni endogeni sau substanțe inhibitoare (SARPE, 2002).

În cazul cercetării de față, ramurile au fost recoltate în perioada aprilie – mai, respectiv în perioada de vegetație, de la arbori tineri, cu vârsta cuprinsă între 2 -3 ani, în cazul soiurilor Chandler și Franquette și respectiv 5 – 7 ani în cazul soiurilor Jupânești, Mihaela și Muscelean.

4.2 METODA DE LUCRU

4.2.1. Prepararea mediului de cultură

Pentru etapele inițiale ale înmulțirii *in vitro* prin micropropagare a nucului comun (*J. regia* L.), respectiv etapa de stabilizare a culturilor și etapa de multiplicare a culturilor am folosit mediu DKW ca și mediu de bază

4.2.2. Stabilizarea microbutașilor

Pentru etapa de stabilizare a microbutașilor am folosit mediu de bază DKW , în care am adăugat: auxină (AIB) în concentrație de 0,1 mg/l, citochinină (BAP) în concentrație de 1 mg/l și 3% zahăr.

După stabilirea valorii de 5,5 a pH-ului mediului de cultură s-a adăugat agentul de gelifiere, iar mediul de cultură a fost sterilizat în autoclav timp de 15 minute la 121 grade Celsius.

După autoclavare vasele cu mediul de cultură se lasă la răcit până în ziua următoare pentru o bună solidificare și pentru a observa dacă există infecții accidentale ale mediului de cultură sau ale vaselor în care s-a turnat mediul de cultură.

Pentru analiza ratei de stabilizare a microbutașilor de nuc, 9 tratamente (trei cultivare cu trei tipuri de agenți de gelifiere) au fost comparate în cadrul unui model factorial complet randomizat.

Factorul A a fost reprezentat de trei soiuri diferite (Franquette, Chandler și Jupânești), iar factorul B a fost reprezentat de trei agenți de gelifiere (2,1 g/l Phytigel, 2,2 g/l Gelrite și 10 g/l agar).

Fiecare tratament a constat în patru repetiții, iar fiecare repetiție a inclus patru microbutași uninodali.

Culturile au fost menținute patru săptămâni pe același mediu de cultură, după care datele au fost colectate, înregistrate și analizate prin analiza varianței și a testului Duncan (Sestras, 2004).

Același model experimental a fost aplicat și pentru studierea comportamentului culturilor e mediu cu tapioca și făină de casava.

4.2.3. Multiplicarea microlăstarilor

Pentru analiza ratei de multiplicare a microlăstarilor am folosit același model experimental ca și la etapa de stabilizare.

Astfel, factorul A a fost reprezentat de aceleași soiuri (Chandler, Jupânești și Franquette), iar factorul B a fost reprezentat de trei concentrații diferite de benzil-amino-purină (0,5 mg/l, 1 mg/l și 1,2 mg/l).

În mediu s-au mai adăugat 0,1 mg/l AIB și zahăr 3%.

Microlăstarii au fost ținuti în camera de creștere la temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ cu fotoperioada cu 16 h lumină/8 h întuneric. Intensitatea luminoasă a fost de $40\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ asigurată de lămpi Phylips fluorescente cu lumină albă (Vahdati et al. 2004).

Culturile au fost menținute patru săptămâni pe același mediu de cultură, după care datele au fost colectate, înregistrate și analizate prin analiza varianței și a testului Duncan.

4.2.4. Înradăcinarea microlăstarilor

Înrădăcinarea *in vitro* a microlăstarilor presupune parcurgerea a două etape: de inducere a înradăcinării și de înradăcinare propriu-zisă.

4.2.4.1 Inducerea înradăcinării

În urma încadrării pe clase de lungime s-au selecționat pentru această etapă microlăstarii cei mai bine dezvoltați, cu lungimea cuprinsă între 2,5- 3 cm.

Pentru etapa de inducere a înradăcinării, am folosit mediu de bază 1 x MS la care am adăugat auxină (AIB) în concentrație de 3 mg/l și zaharoză 3%.

4.2.4.2 Înradăcinarea propriu-zisă

La sfârșitul perioadei de inducție, am transferat plantele pe mediul de înradăcinare propriu-zisă.

Pentru înradăcinarea propriu-zisă a plantelor aparținând celor trei soiuri de nuc (Chandler, Franquette și Jupânești) am folosit mediul de bază $\frac{1}{4}$ x DKW la care am adăugat vermiculită Granutec E.

La amestec am mai adăugat zaharoză (3%) și Phytigel (2.4 g/l), iar pH-ul a fost stabilit la 5.5.

La sfârșitul etapei de înradăcinare am determinat următoarele caracteristici: procentul de explante înradăcinate, numărul total de rădăcini principale, numărul total de rădăcini secundare, lungimea medie a rădăcinilor primare, numărul mediu de rădăcini

primare pentru fiecare explant înrădăcinat, numărul mediu de frunze pe plantă și lungimea medie a tulpinii.

Culturile au fost menținute în camera de creștere timp de 30 de zile, la temperatura de 28°C, cu 16 h fotoperioada și intensitatea luminii între 40-60 $\mu\text{M/s/m}^2$.

4.2.5. Aclimatizarea în seră a plantelor

Pentru aclimatizare s-au folosit: 8 plante din soiul Chandler, 10 plante din soiul Jupânești și 7 plante din soiul Franquette.

Numărul de plante tratate cu Promalin a fost următorul: 4 plante din soiul Chandler, 5 plante din soiul Jupânești și 4 plante din soiul Franquette.

Numărul total de plante tratate cu Dormex a fost următorul: 4 plante din soiul Chandler, 5 plante din soiul Jupânești și 3 plante din soiul Franquette.

La sfârșitul perioadei de aclimatizare am analizat următoarele caracteristici: numărul final de plante aclimatizate după tratarea cu Promalin și Dormex, înălțimea medie a plantelor tratate cu Promalin și Dormex, numărul mediu de frunze pe plantă în urma tratamentului cu Promalin și Dormex.

CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

La înmulțirea *in vitro* a nucului comun (*J. regia L.*) prin micropropagare am observat o foarte bună pretabilitate a soiurilor românești pentru această metodă.

Soiul românesc Jupânești și două soiuri străine (Chandler și Franquette) au fost folosite pe tot parcursul procesului de micropropagare până la transferul în câmp deschis.

Pentru testarea eficacității a doi agenți de gelifiere alternativi (tapioca și făina de cassava) asupra stabilizării microbutașilor am folosit explante provenite de la trei soiuri românești (Jupânești, Muscelean și Mihaela).

Rezultatele și discuțiile sunt prezentate în continuare.

5.1 ETAPA STABILIZĂRII IN VITRO A MICROBUTAȘILOR

5.1.1. Rezultate privind influența genotipului și a agentului de gelifiere asupra lungimii microlăstarilor

În prima variantă a etapei stabilizării microbutașilor s-au folosit trei agenți de gelifiere convenționali (Gelrite, Phytigel și agar) și trei soiuri (Jupânești, Chandler și Franquette).

Aranjarea sistematică a datelor experimentale este prezentată în tabelul de mai jos.

Tabelul 3 /Table 3

Aranjarea sistematica a datelor pe variante si repetitii

The systematic arrangement of datas on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Variant average
		I	II	III	IV		
11	Franquette/Phytigel	1.3	1.4	1.4	1.35	5.45	1.4
12	Franquette/Gelrite	0.9	1	1.1	1	4	1.0
13	Franquette/agar	1.2	1.3	1.2	1.3	5	1.3
21	Chandler/Phytigel	1.56	1.5	1.55	1.45	6.06	1.5
22	Chandler/Gelrite	1.4	1.3	1.32	1.25	5.27	1.3
23	Chandler/agar	1.5	1.4	1.35	1.2	5.45	1.4
31	Jupanesti/Phytigel	1.45	1.5	1.5	1.5	5.95	1.5
32	Jupanesti/Gelrite	0.84	1.1	1.1	1	4.04	1.0
33	Jupanest/agar	1.29	1.35	1.35	1.2	5.19	1.3
	Suma B	11.44	11.85	11.87	11.25	46.41	

Tabelul 4 /Table 4

Înălțimea microlăstarilor (cm) după 4 săptămâni de la inocularea acestora sub influența a trei cultivare și trei agenți de gelifiere

The height of microshoots (cm) after 4 weeks of the microcuttings inoculation under the influence of three cultivars and three gelling agents

Soi/ Cultivar	Agent de gelifiere/ Geling agent			Medie soi/ Cultivar average
	Phytigel	Gelrite	Agar	
Franquette	1.36 c	1 d	1.25 c	1.20 A
Chandler	1.52 a	1.32 c	1.36 c	1.40 B
Jupanesti	1.49 a	1.01 d	1.3 c	1.27 A
Medie agent de gelifiere/ Geling agent average	1.46 M	1.1 N	1.3 O	

ds5% for the comparison of two cultivars average 0.06

ds5% for the comparison of two gelling agents 0.01

ds5% for the comparison of two cultivars average x two gelling agents 0.11 - 0.12

În această etapă de stabilizare a microbutașilor de nuc și de început a creșterii lăstarilor de nuc s-au folosit trei tipuri de agenți de gelifiere (Gelrite, Phytigel și agar).

După patru săptămâni de la inoculare cea mai bună stabilizare a microbutașilor a fost înregistrată de soiul Chandler, iar cea mai slabă stabilizare a microbutașilor a fost înregistrată de soiul Franquette.

Microbutașii aparținând soiului Jupânești s-au adaptat, în general, mai greu pe toate variantele mediului de stabilizare, însă odată stabilizați microbutașii au lăstărit destul de ușor.

În ceea ce privește rolul agenților de gelifiere asupra creșterii microlăstarilor, din datele înregistrate am observat că, microlăstarii au crescut cel mai bine pe mediul de cultură gelificat cu Phytigel.

Cele mai slabe creșteri ale microlăstarilor de nuc le-am înregistrat pe mediile de cultură gelificate cu Gelrite.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu cele trei tipuri de agenți de gelifiere, cea mai scăzută rată a creșterii microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Franquette pe mediul de cultură DKW gelificat cu Gelrite și la soiul Jupânești pe mediul de cultură DKW gelificat cu Gelrite.

Cele mai bune rezultate pentru soiul Chandler le-am obținut pe mediul de cultură DKW gelificat cu Phytigel.

Pentru soiul Jupânești am obținut de asemenea o stabilizare și o creștere bună a microlăstarilor folosind același mediu de cultură DKW gelificat cu Phytigel.

5.1.2. Rezultate privind influența genotipului și a agentului de gelifiere alternativ asupra lungimii microlăstarilor

În a doua variantă a etapei stabilizării microbutașilor s-au folosit doi agenți de gelifiere alternativi (făina de casava și tapioca) și un agent de gelifiere convențional (agarul) și respectiv trei soiuri românești (Muscelean, Mihaela și Jupânești).

Aranjarea sistematică a datelor experimentale este prezentată în tabelul de mai jos.

Tabelul 5 /Table 5

Aranjarea sistematică a datelor pe variante si repetiții

The systematic arrangement of datas on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Variant average
		I	II	III	IV		
11	Jupanesti/agar	0.85	1	0.75	1.45	4.05	1.0
12	Jupanesti/Cassava flour	0.6	0.66	0.68	1	2.94	0.7
13	Jupanesti/Tapioca	1.43	1.41	1.41	1.43	5.68	1.4
21	Mihaela/agar	1	0.75	0.85	1	3.6	0.9
22	Mihaela/Cassava flour	0.48	0.5	0.47	0.41	1.86	0.5
23	Mihaela/Tapioca	1.1	1.19	1.21	1.23	4.73	1.2
31	Muscelean/agar	1.23	1.22	1.3	1.24	4.99	1.2
32	Muscelean/Cassava flour	0.6	0.2	0.4	0.5	1.7	0.4
33	Muselean/Tapioca	1	1.35	1.24	1.2	4.79	1.2
	suma B	8.29	8.28	8.31	9.46	34.34	

Tabelul 6 /Table 6

Înălțimea lăstarilor de nuc (cm) după patru săptămâni de la inoculare sub influența a trei cultivare și trei agenți de gelifiere

The height of walnut shoots (cm) after 4 weeks of inoculation under the influence of three cultivars and three gelling agents

Soi/ Cultivar	Agent de gelificare/ Geling agent			Media soi/ Cultivar average
	Agar	Cassava flour	Tapioca	
Jupanesti	1.01 cdg	0.74 e	1.42 a	1.06 A
Mihaela	0.9 de	0.47 f	1.18 bc	0.85 B
Muscelean	1.25 ab	0.43 f	1.2 bc	0.96 C
Media agent de gelifiere/ Geling agent average	1.1 M	0.5 N	1.3 O	

ds5% for the comparison of two cultivars average 0.12

ds5% for the comparison of two gelling agents 0.12

ds5% for the comparison of two cultivars average x two gelling agents 0.21 - 0.24

În urma experimentelor realizate cu cei doi agenți de gelifiere alternativi am observat că mediul de cultură a intrat într-un proces de degradare mult mai rapid, respectiv după 14 zile de la preparare.

În etapa de stabilizare, microbotașii au fost transferați pe mediu proaspăt o dată la două săptămâni.

După 30 de zile cea mai bună stabilizare a microbotașilor a fost înregistrată de soiul Jupânești, iar cea mai slabă stabilizare a microbotașilor a fost înregistrată de soiul Muscelean.

De asemenea și microbotașii aparținând soiului Mihaela s-au caracterizat printr-o stabilizare destul de slabă.

În ceea ce privește rolul agenților de gelifiere asupra creșterii lăstarilor, din datele înregistrate s-a observat că, microlăstarii au crescut cel mai bine pe mediul de cultură gelificat cu tapioca.

Cele mai slabe creșteri ale microlăstarilor de nuc s-au înregistrat pe mediile de cultură gelificate cu făina de casava.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu un agent de gelifiere alternativ, cea mai scăzută rată a creșterii microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Mihaela pe mediul de cultură DKW gelificat cu făina de casava și la soiul Muscelean pe același mediu de cultură DKW gelificat cu făina de casava.

Cele mai bune rezultate au fost obținute de soiul Jupânești pe mediu de cultură DKW gelificat cu tapioca.

Spre deosebire de celelalte două soiuri, în cazul soiului Muscelean, cea mai bună rată a stabilizării s-a obținut pe mediul gelificat cu agar.

5.2 ETAPA DE MULTIPLICARE *IN VITRO* A MICROLĂSTARILOR

La sfârșitul etapei de stabilizare microlăstării au fost separați și transferați apoi pe mediu de multiplicare.

Pentru multiplicarea culturilor am folosit mediu de bază DKW și trei concentrații diferite de citochinină (BAP), respectiv 0,5 mg/l, 1 mg/l și 1,2 mg/l.

5.2.1. Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra numărului de microlăstari

Datele referitoare la influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra numărului de microlăstari sunt prezentate sistematic în tabelul de mai jos.

Tabelul 7/Table 7

Așezarea sistematică pe variante și repetiții

Sistematic arrangement on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Variant average
		I	II	III	IV		
11	Chandler/BA0.5	1	1	1	1	4	1.0
12	Chandler/BA1	1.25	1.5	1.5	1.25	5.5	1.4
13	Chandler/BA1.2	1.25	1.25	1.5	1.25	5.25	1.3
21	Jupanesti/BA0.5	1.5	1.25	2	1.25	6	1.5
22	Jupanesti/BA1	2	2	2.25	2	8.25	2.1
23	Jupanest/BA1.2	1.25	1.5	1	1	4.75	1.2
31	Franquette/BA0.5	1	1	1	1	4	1.0
32	Franquette/BA1	1.25	1.5	1.5	1.5	5.75	1.4
33	Franquette/BA1.2	1.5	1.5	1.25	1.5	5.75	1.4
	suma B	12	12.5	13	11.75	49.25	

Tabelul 8/Table 8

Numărul microlăstarilor după 4 săptămâni de la inoculare sub influența a trei cultivare și trei agenți de gelifiere

The number of microshoots (cm) after 4 weeks of inoculation under the influence of three cultivars and three gelling agents

Soi Cultivar	Citochinină Citochinină			Media soi/ Cultivar average
	BAP (0.5mg/l)	BAP (1 mg/l)	BAP (1.2mg/l)	
Chandler	1 de	1.38 bc	1.31 bc	1.23 C
Jupanesti	1.5 b	2.06 a	1.19 cde	1.58 A
Franquette	1 e	1.44 bc	1.44 bc	1.29 B
Media agent de gelifiere/Geling agent average	1.17 O	1.63M	1.31N	

După patru săptămâni de la transferul plantelor pe mediul de multiplicare, cea mai bună rată de multiplicare a microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Jupânești, iar cea mai slabă rată de multiplicare a microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Franquette.

Microlăstarii aparținând soiului Chandler s-au caracterizat printr-o rată de multiplicare medie.

În ceea ce privește influența citochininei asupra multiplicării microlăstarilor, din datele înregistrate am observat că, numărul cel mai mare de microlăstari s-a înregistrat pe mediul de cultură cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

Cea mai slabă rată de multiplicare a microlăstarilor de nuc s-a înregistrat pe mediile de cultură și BAP în concentrație de 0.5 mg/l.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu BAP, cea mai scăzută rată de multiplicare a microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Chandler și mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 0,5 mg/l și la soiul Franquette pe același mediu de cultură DKW cu BAP în concentrație de 0,5 mg/l.

Cele mai bune rezultate au fost obținute la soiul Jupânești pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

Pe mediul de cultură DKW cu 1 mg/l BAP cea mai mare rată a proliferării a fost obținută la soiul Jupânești (în medie 2-3 microlăstari).

5.2.2. Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochină asupra înălțimii microlăstarilor

Influența concentrației de citochină asupra creșterii în înălțime a microlăstarilor de nuc a fost analizată după patru săptămâni de la tranferul microlăstarilor pe mediul de multiplicare.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele de mai jos.

Tabelul 9/Table 9

Aranjarea sistematică pe variante și repetiții
Systematic arrangement on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Variant average
		I	II	III	IV		
11	Chandler/BA0.5	2.35	2.2	2.55	2.52	9.62	2.4
12	Chandler/BA1	3.78	3.8	3.82	3.8	15.2	3.8
13	Chandler/BA1.2	3.31	3.34	3.38	3.45	13.48	3.4
21	Jupanesti/BA0.5	3	2.62	2.75	2.72	11.09	2.8
22	Jupanesti/BA1	3.78	3	3.44	3.4	13.62	3.4
23	Jupanest/BA1.2	3.46	3.41	3.45	3.5	13.82	3.5
31	Franquette/BA0.5	1.58	1.85	1.48	1.65	6.56	1.6
32	Franquette/BA1	2.65	2.64	2.78	3.75	11.82	3.0
33	Franquette/BA1.2	2.19	2.35	2.35	2.38	9.27	2.3
	suma B	26.1	25.21	26	27.17	104.48	

Tabelul 10 /Table 10

Înălțimea microlăstarilor de nuc (cm) la 4 săptămâni de la inoculare sub influența a trei cultivare și trei concentrații de BAP

The height of walnut microshoots (cm) after 4 weeks of inoculation under the influence of three cultivars and three BAP concentrations

Soi/ Cultivar	Citochină Cytokinin			Media soi/ Cultivar average
	BAP (0.5mg/l)	BAP (1 mg/l)	BAP (1.2mg/l)	
Chandler	2.41 d	3.8 a	3.37 b	3.19 A
Jupanesti	2.77 c	3.41 b	3.46 b	3.21 A
Franquette	1.64 e	2.96 c	2.32 d	2.30 B
Media agent	2.27 M	3.39 N	3.05 O	

de gelificare/ Geling agent average				
---	--	--	--	--

ds5% for the comparison of two cultivars average 0.19

ds5% for the comparison of two BAP concentrations 0.19

ds5% for the comparison of two cultivars average x BAP concentrations 0.33 - 0.4

Din datele obținute rezultă că, cea mai mare creștere în înălțime a microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Jupânești, iar cea mai mică creștere în înălțime a microlăstarilor a fost înregistrată la soiul Franquette.

De asemenea, creșterea în înălțime a microlăstarilor aparținând soiului Chandler a fost destul de bună.

În ceea ce privește influența citochininei asupra creșterii în înălțime a microlăstarilor, din datele înregistrate am observat că, microlăstarii au crescut cel mai bine pe mediul de cultură cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

Cel mai mic număr de microlăstari s-a înregistrat pe mediile de cultură cu BAP în concentrație de 0.5 mg/l.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu BAP, cel mai scăzut nivel de creștere în înălțime a microlăstarilor a fost înregistrat la soiul Franquette pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 0,5 mg/l .

Cea mai mare creștere în înălțime a microlăstarilor s-a înregistrat la combinația Chandler pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

5.2.3. Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochină asupra numărului de frunze/microlăstar

Un alt aspect important analizat în etapa de multiplicare a fost studiul influenței concentrației de citochină asupra numărului de frunze pe microlăstari.

Datele obținute sunt prezentate sistematic în tabelele de mai jos.

Tabelul 11/Table 11

Aranjarea sistematică a datelor pe variante și repetiții
Sistematic arrangement of datas on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Variant average
		I	II	III	IV		
11	Chandler/BA0.5	4.5	4.25	4.5	4.5	17.75	4.4
12	Chandler/BA1	7.25	7.25	7.5	7.25	29.25	7.3
13	Chandler/BA1.2	6.25	6.25	6.5	6.5	25.5	6.4
21	Jupanesti/BA0.5	4.25	4.5	4.5	4.25	17.5	4.4
22	Jupanesti/BA1	7.75	7.5	7.5	7.5	30.25	7.6

23	Jupanest/BA1.2	6.75	6.5	6.5	6.75	26.5	6.6
31	Franquette/BA0.5	3.75	3	3.25	3.25	13.25	3.3
32	Franquette/BA1	5.5	6	5.5	5.75	22.75	5.7
33	Franquette/BA1.2	4	4.75	4.75	4.5	18	4.5
	suma B	50	50	50.5	50.25	200.75	

Tabelul 12 /Table 12

Numărul de frunze pe un microlăstar la 4 săptămâni de la inoculare sub influența a trei cultivari și trei concentrații de BAP

The number of leaves on a microshoot after 4 weeks of inoculation under the influence of three cultivars and three BAP concentrations

Soi/ Cultivar	Citochinină Cytokinin			Media soi/ Cultivar average
	BAP (0.5mg/l)	BAP (1 mg/l)	BAP (1.2mg/l)	
Chandler	4.44 c	7.31 a	6.38 b	6.04 B
Jupanesti	4.38 c	7.56 a	6.63 b	6.19 B
Franquette	3.31 e	5.69 d	4.5 c	4.50 A
Media agent de gelificare/ Geling agent average	4.04 M	6.85 N	5.83 O	

ds5% for the comparison of two cultivars average 0.18

ds5% for the comparison of two BAP concentrations 0.18

ds5% for the comparison of two cultivars average x BAP concentrations 0.32 - 0.4

Din datele obținute rezultă că, cel mai mare număr de frunze/microlăstari a fost înregistrat la soiul Jupânești (Fig. 29), iar cel mai mic număr de microlăstari a fost înregistrat la soiul Franquette.

De asemenea și la soiul Chandler numărul de frunze/microlăstari a fost destul de mare.

În ceea ce privește influența citochininei asupra numărului de frunze/microlăstari, cele mai bune rezultate au fost obținute pe mediul de cultură cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

Cel mai mic număr de frunze/microlăstari s-a înregistrat pe mediile de cultură cu BAP în concentrație de 0.5 mg/l.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu BAP, cel mai mic număr de frunze/microlăstari a fost înregistrat la soiul Franquette pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 0,5 mg/l.

Cel mai mare număr de frunze/microlăstari s-a înregistrat la soiul Chandler pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

În cazul variantei soi și mediu de cultură cu BAP în concentrație de 1,2 mg/l cel mai mare număr de frunze/microlăstari a fost înregistrat la soiul Jupânești.

5.2.4. Rezultate privind influența genotipului și a concentrației de citochinină asupra lungimii frunzelor/microlăstari

Datorită faptului că aparatul foliar reprezintă principala cale de absorbție a energiei și a substanțelor nutritive necesare dezvoltării plantelor după depășirea etapelor de înmulțire *in vitro*, o altă caracteristică importantă care am analizat-o în etapa de multiplicare a fost studiul influențe soiului și a concentrației de citochinină asupra lungimii frunzelor/microlăstari.

Datele obținute sunt prezentate sistematic în tabelele următoare.

Tabelul 13 /Table 13

Aranjarea sistematică a datelor pe variante și repetiții

Sistematic arrangement of datas on variants and repetitions

Numarul variante No. of variant	Denumirea variantei Name of variant	Blocul (repetitia) Block (repetition)				Suma variantei Sum of variant	Media variantei Average of variant
		I	II	III	IV		
11	Chandler/BA0.5	1.9	1.85	1.8	1.7	7.25	1.8
12	Chandler/BA1	2.8	2.71	2.77	2.75	11.03	2.8
13	Chandler/BA1.2	2.5	2.7	2.3	2.38	9.88	2.5
21	Jupanesti/BA0.5	1.8	1.67	1.79	1.73	6.99	1.7
22	Jupanesti/BA1	2.79	2.72	2.77	2.89	11.17	2.8
23	Jupanest/BA1.2	2.25	2.24	2.28	2.35	9.12	2.3
31	Franquette/BA0.5	1.25	1.27	1.39	1.38	5.29	1.3
32	Franquette/BA1	2.67	2.72	2.89	2.76	11.04	2.8
33	Franquette/BA1.2	2.25	2.29	2.3	2.26	9.1	2.3
	suma B	20.21	20.17	20.29	20.2	80.87	

Tabelul 14 /Table 14

The leaves length after 4 weeks of inoculation under the influence of three cultivars and three BAP concentrations

Lungimea frunzelor după 4 săptămâni de la inoculare sub influența a trei cultivare și trei concentrații de BAP

Soi/ Cultivar	Citochinină Cytokinin			Media soi/ Cultivar average
	BAP (0.5mg/l)	BAP (1 mg/l)	BAP (1.2mg/l)	
Chandler	1.81 d	2.76 a	2.47 b	2.35 A
Jupanesti	1.75 d	2.79 a	2.28 c	2.27 A
Franquette	1.32 e	2.76 a	2.28 c	2.12 B
Media agent de gelificare/ Geling agent average	1.63 M	2.77 N	2.34 O	

ds5% for the comparison of two cultivars average 0.08

ds5% for the comparison of two BAP concentrations 0.08

ds5% for the comparison of two cultivars average x BAP concentrations 0.13 - 0.15

Din datele obținute rezultă că, cea mai mare creștere în lungime a frunzelor/microlăstari a fost înregistrată la soiul Jupânești, iar cea mai mică creștere în lungime a frunzelor/microlăstari a fost înregistrată la soiul Franquette.

În ceea ce privește influența citochininei asupra creșterii în lungime a frunzelor, din datele înregistrate am observat că, frunzele s-au dezvoltat mai bine pe mediul de cultură cu BAP în concentrație de 1 mg/l.

Pe mediile de cultură cu BAP în concentrație de 0.5 mg/l frunzele s-au dezvoltat cel mai puțin.

În ceea ce privește combinațiile dintre soi și mediu de cultură cu BAP, cea mai slabă creștere în lungime a frunzelor a fost înregistrată la soiul Franquette pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 0,5 mg/l.

În cazul variantei soi și mediu de cultură cu BAP cea mai mare creștere în lungime a frunzelor a fost înregistrată la soiul Jupânești pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1mg/l, dar și la celelalte două soiuri, respectiv soiul Chandler pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1 mg/l și soiul Franquette pe mediul de cultură DKW cu BAP în concentrație de 1mg/l s-au înregistrat creșteri în lungime a frunzelor apropiate de valoarea maximă.

După analiza finală a etapei de multiplicare se poate spune că, soiul românesc Jupânești se caracterizează printr-o bună capacitate de multiplicare dar și printr-o bună capacitate de dezvoltare a aparatului foliar.

Pe toată durata etapei de multiplicare *in vitro* a microlăstarilor a fost menținută temperatura în jurul valorii de 25°C. La acest nivel al temperaturii microlăstarii s-au dezvoltat destul de bine, nefiind prezent fenomenul de necrozare a frunzelor.

5.3 ETAPA DE ÎNRĂDĂCINARE *IN VITRO* A PLANTELOR DE NUC

5.3.1. Importanța temperaturii, carbohidraților, auxinei și a perioadei de inducție pentru inducerea înrădăcinării plantelor de nuc

Temperatura

Pentru etapa de inducere a înrădăcinării am stabilit un nivel al temperaturii la 22°C.

Carbohidrații reprezintă principala sursă de energie pentru culturile *in vitro*, caz în care fotosinteza este redusă considerabil.

Pentru asigurarea unei bune dezvoltări a culturilor *in vitro* trebuie respectate cu atenție următoarele caracteristici ale luminii: intensitatea, perioada de iluminare și tipul de iluminare.

Timpul de inducție pentru cultura *in vitro* a nukului a fost de 8 zile.

Pentru inducerea înrădăcinării microlăstarilor de nuc, am folosit ca mediu de bază: 1 x MS suplimentat cu 3 mg/l AIB, 4 % zaharoză și 9g/l agar Kobe.

pH-ul mediului a fost de 5.5, timpul de inducție a fost de 8 zile la întuneric.

În urma încadrării pe clase de lungime s-au selecționat pentru etapa de inducere a înrădăcinării microlăstarii cel mai bine dezvoltate cu lungimea cuprinsă între 2,5-3cm.

După selecția pe clase de lungime, am îndepărtat calusul de la fiecare microlăstar prin secționare.

5.3.2. Rezultate privind influența genotipului asupra înrădăcinării propriu-zise a plantelor de nuc

Mediul de cultură a fost suplimentat cu 3% zaharoză, Phytigel (2.4 g/l), iar pH-ul a fost stabilizat la 5.5.

După stabilirea structurii amestecului, acesta s-a sterilizat în autoclav timp de 15 minute la 121°C.

Plantulele au fost menținute pe substratul de înrădăcinare *in vitro* o perioadă de 30 de zile, după care datele au fost observate, înregistrate și analizate.

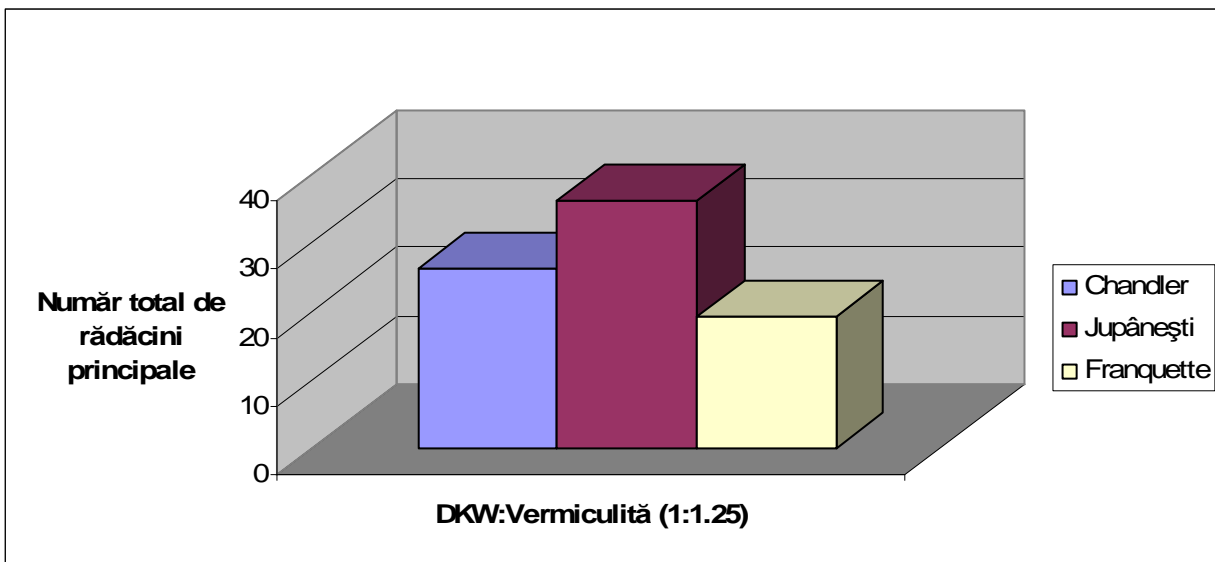


Fig. 3. Numarul total de rădăcini principale în funcție de soi

Fig. 3. Total number of principal roots depending on variety

Din datele prezentate mai sus se poate spune că amestecul: 1x4 DVW/vermiculită (1:1.25) a favorizat dezvoltarea plantelor provenite de la cele trei soiuri de nuc.

Soiul Jupânești a înregistrat cel mai mare număr total de rădăcini principale, respectiv 36 de rădăcini/număr total de plante înrădăcinate, iar cea mai mic număr total de rădăcini a fost înregistrat de soiul Franquette, respectiv 19 rădăcini/număr total de plante înrădăcinate.

Soiul Chandler a avut o evoluție destul de bună, înregistrând un număr de 26 de rădăcini principale/număr total de plante înrădăcinate.

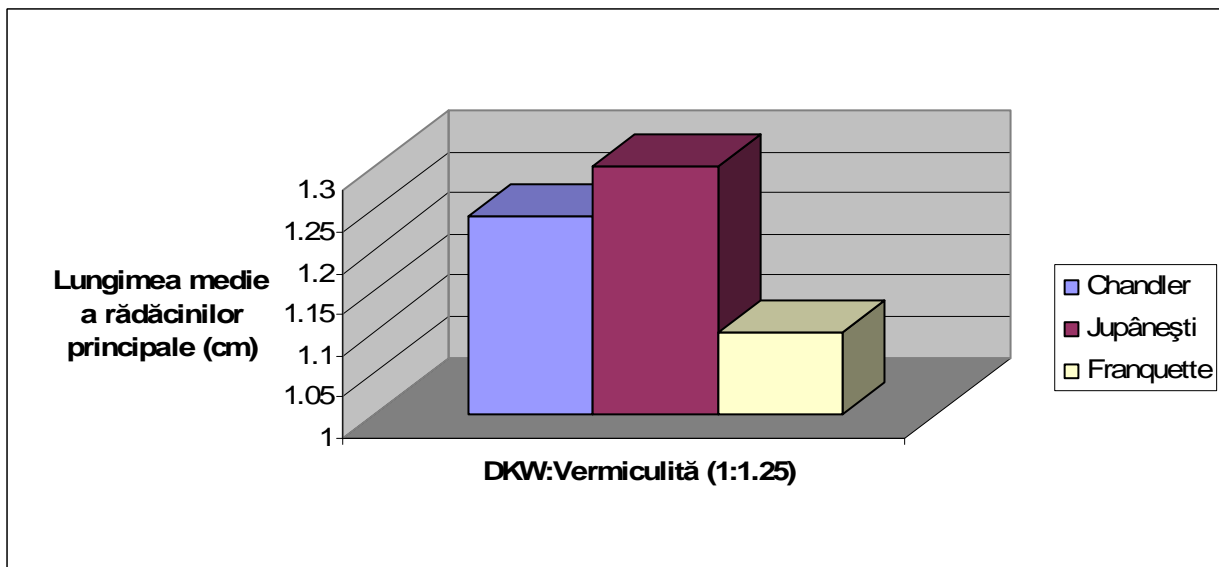


Fig. 4. Lungimea medie a rădăcinilor principale în funcție de soi

Fig. 4. Average length of principal roots depending on variety

În ceea ce privește lăgimea medie a rădăcinilor principale, la soiul Jupânești s-a înregistrat cea mai bună creștere, respectiv 1.3 ± 0.09 cm, iar soiul Franquette a înregistrat cea mai slabă creștere, respectiv 1.10 ± 0.06 cm.

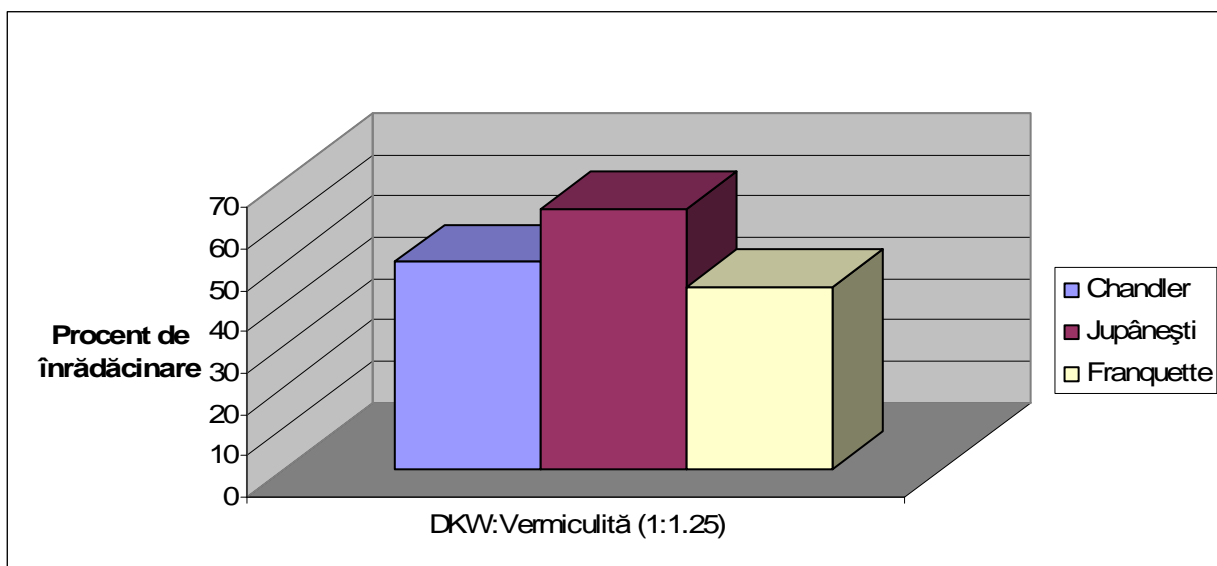


Fig. 5. Procentul de înrădăcinarea plantelor de nuc în funcție de soi
 Fig. 5. Rooting percentage of walnut plants depending on variety

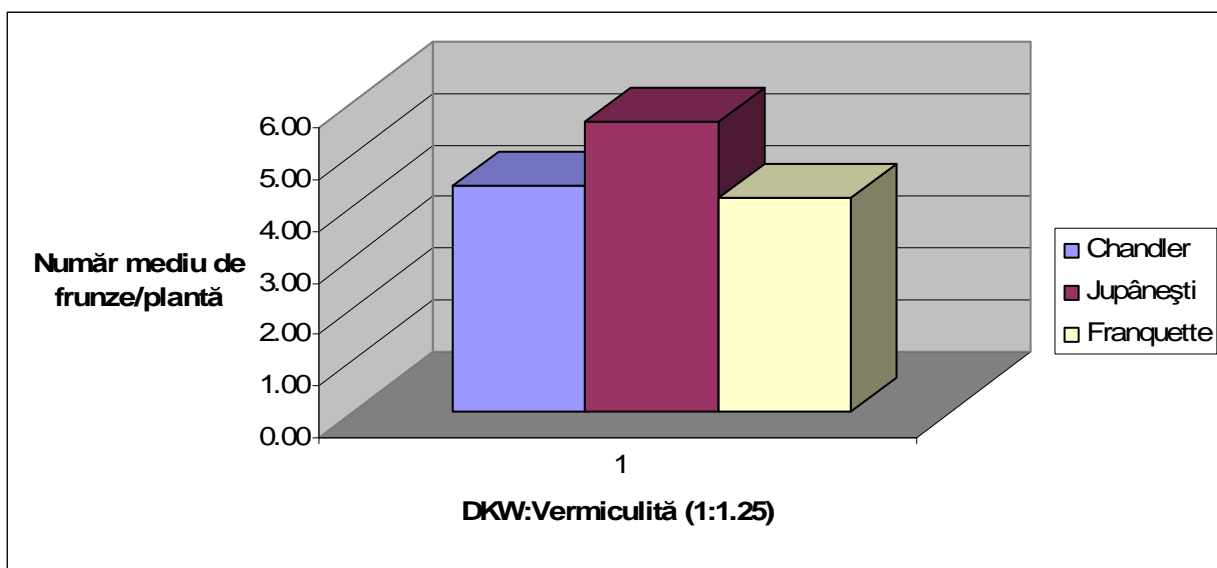


Fig. 6. Numărul mediu de frunze/plantă în funcție de soi
 Fig. 6. Average number of leaves/ plant depending on variety

Cea mai mare valoare a numărului mediu de frunze/plantă a fost înregistrată la soiul Jupânești, respectiv 5.6 ± 0.20 , iar cea mai mică valoare a numărului mediu de frunze/plantă a fost înregistrată la soiul Franquette, respectiv 4.14 ± 0.14 .

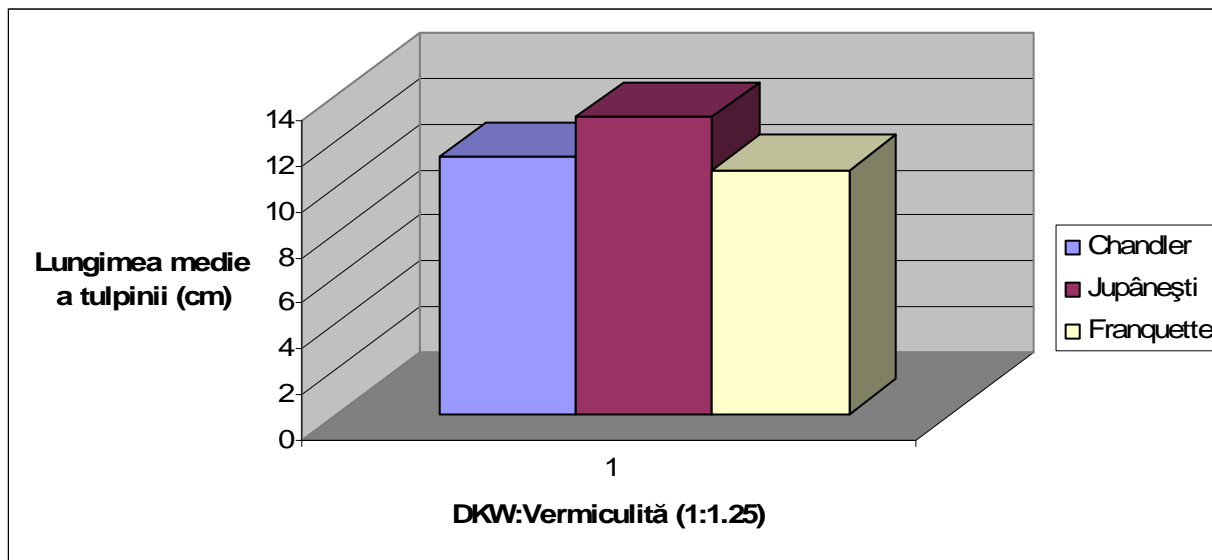


Fig. 7. Lungimea medie a tulpinii în funcție de soi

Fig. 7. Average stem length depending on variety

În ceea ce privește lungimea medie a tulpinii, cea mai bună creștere a fost înregistrată la soiul Jupânești, respectiv 13.01 ± 0.41 cm, iar creșterea cea mai mică a fost înregistrată la soiul Franquette, respectiv 10.68 ± 0.34 cm.

În ceea ce privește numărul mediu de rădăcini primare/număr de explante înrădăcinate cea mai mare valoare a fost înregistrată la soiul Jupânești, respectiv 3.6 ± 0.22 , iar cel mai mic număr mediu de rădăcini primare/număr de explante înrădăcinate a fost înregistrat la soiul Franquette, respectiv 2.71 ± 0.29 .

5.4 ETAPA DE ACLIMATIZARE ÎN SERĂ A PLANTELOR DE NUC

La sfârșitul etapei de înrădăcinare, plantele tinere de nuc au fost transferate în seră, după ce în prealabil, s-a pregătit substratul de cultură și condițiile de creștere.

Pentru stimularea creșterii plantelor s-au aplicat doi regulatori de creștere: Promalin (19g/l benziadenină și 19g/l giberelină) și Dormex (520g/l hidrogen cianamid).

Factorii principali care condiționează reușita procesului de aclimatizare sunt următorii:

- calitatea plantelor destinate aclimatizării (dormanța mugurilor terminali, sistemul radicular);
- calitatea substratului utilizat pentru aclimatizarea plantelor;
- condițiile de mediu din interiorul spațiului de aclimatizare (temperatura, umiditatea, lumina).

Numărul de rădăcini/plantă a fost în medie de 3 (între 2 și 3 rădăcini principale la soiul Franquette și 2 -4 rădăcini principale la soiul Jupânești).

Ca și substrat de aclimatizare s-a folosit Steckmedium (substrat special creat pentru cultura *in vitro* a nucului în scopul îmbunătățirii dezvoltării sistemului foliar și a eliminării necrozării plantelor) furnizat de firma Klasmann-Deilman (Germania).

După plantarea în ghivece, pe parcursul perioadei de aclimatizare datele au fost urmărite, înregistrate și analizate.

Tabelul 15 /Table 15

Sistematizarea datelor în funcție de regulatori de creștere utilizați (1)

Datas sistematisation depending on growth regulators used (1)

Soiul Cultivar	Caracteristici Characteristics				
	Număr total de plante folosite la aclimatizare/ Total no. of plants for acclimatization	Număr plante tratate cu Promalin/ No. of plants treated with Promalin	Număr final de plante aclimatizate/ Final no. of acclimataded plants	Număr plante tratate cu Dormex/ No. of plants treated with	Număr final de plante aclimatizate/ Final no. of acclimataded plants
Chandler	8	4	3	4	4
Jupânești	10	5	5	5	4
Franquette	7	4	2	3	1

Pe parcursul aclimatizării plantelor a fost menținută o temperatură cu valori cuprinse între 22 și 24⁰C, la un nivel maxim al umidității (100%).

Tabelul 16/Table 16

Sistematizarea datelor în funcție de regulatori de creștere utilizați (2)

Datas sistematisation depending on growth regulators used (2)

Soiul/ Cultivar	Caracteristici Characteristics					
	% de plante aclimatizate/ % of acclimatized plants		Înălțimea medie a plantelor la sfârșitul perioadei de aclimatizare (cm)/ Average height of plants (cm) at the end of acclimatization period		Număr mediu de frunze/plantă la sfârșitul perioadei de aclimatizare/ Average number of leaves/plant at the end of the acclimatization period	
	Plante tratate cu Promalin/	Plante tratate cu	Plante tratate cu Promalin/	Plante tratate cu Dormex/	Plante tratate cu Promalin/	Plante tratate cu Dormex/

	Plants treated with promalin	Dormex/ Plants treated with Dormex	Plants treated with promalin	Plants treated with Dormex	Plants treated with promalin	Plants treated with Dormex
Chandler	75	100	21±0.39	19±0.53	5.67±0.33	5.25±0.25
Jupânești	100	75	23±0.39	21.23±0.51	6.4±0.4	6.25±0.25
Franquette	50	25	20.35±0.15	17.5	4.10±0.5	4

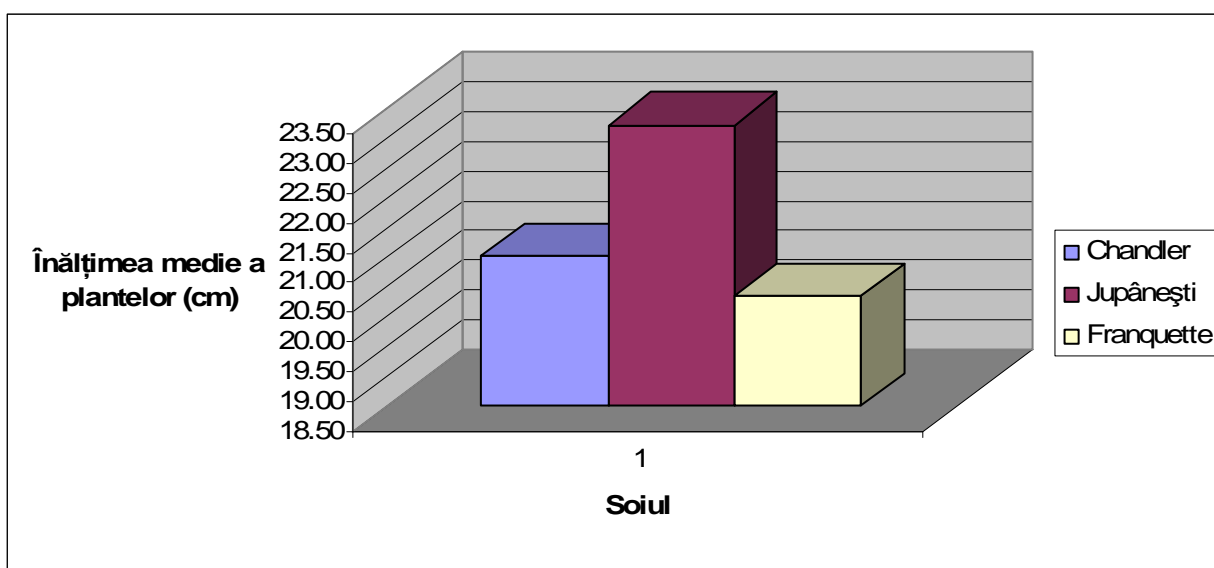


Fig. 8. Înălțimea medie a plantelor tratate cu Promalin
Fig. 8. Average plants height treated with Promalin

Din cauza complexității procesului de acclimatizare, în această etapă s-a realizat un experiment pilot pentru a se urmări evoluția plantelor de nuc sub influența a două tipuri de regulatori de creștere.

În urma tratării plantelor cu cele două tipuri de regulatori de creștere s-a observat că, plantele tratate cu Promalin s-au dezvoltat mult mai bine decât plantele tratate cu Dormex.

După tratarea plantelor cu Promalin, cea mai mare înălțime medie a fost înregistrată de soiul Jupânești, respectiv 23±0.39 cm, iar cea mai mică înălțime medie a fost înregistrată de soiul Franquette, respectiv 20.35±0.15 cm.

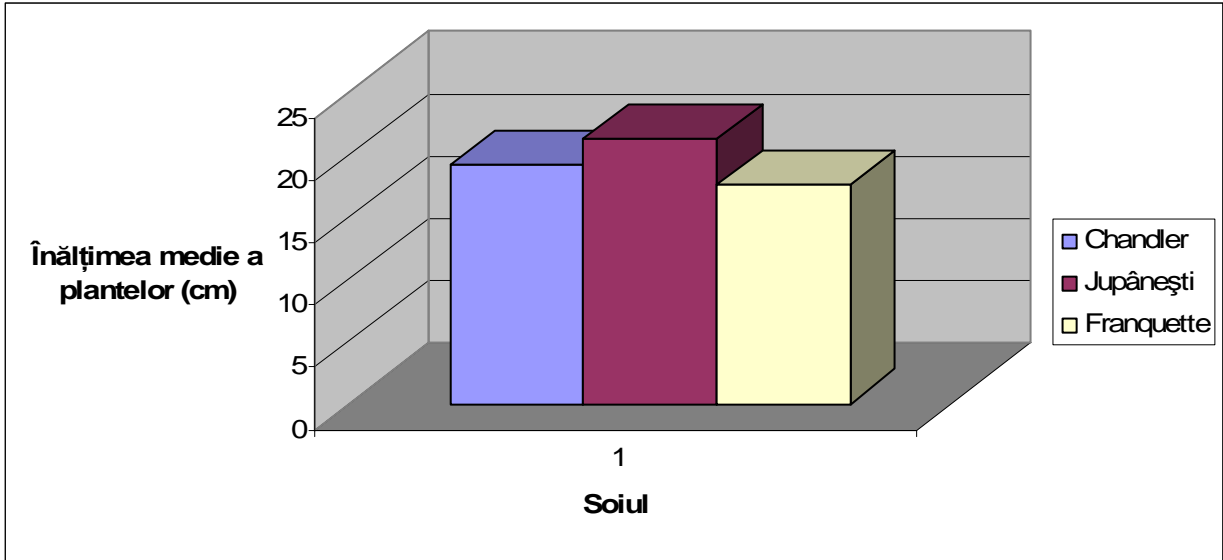


Fig. 9. Înălțimea medie a plantelor tratate cu Dormex
 Fig. 9. Average plants height treated with Dormex

În cazul tratării plantelor cu Dormex, la soiul Jupânești s-a înregistrat cea mai mare înălțime medie de 21.23 ± 0.51 cm, iar la soiul Franquette s-a înregistrat cea mai mică înălțime, respectiv 17.5 cm.

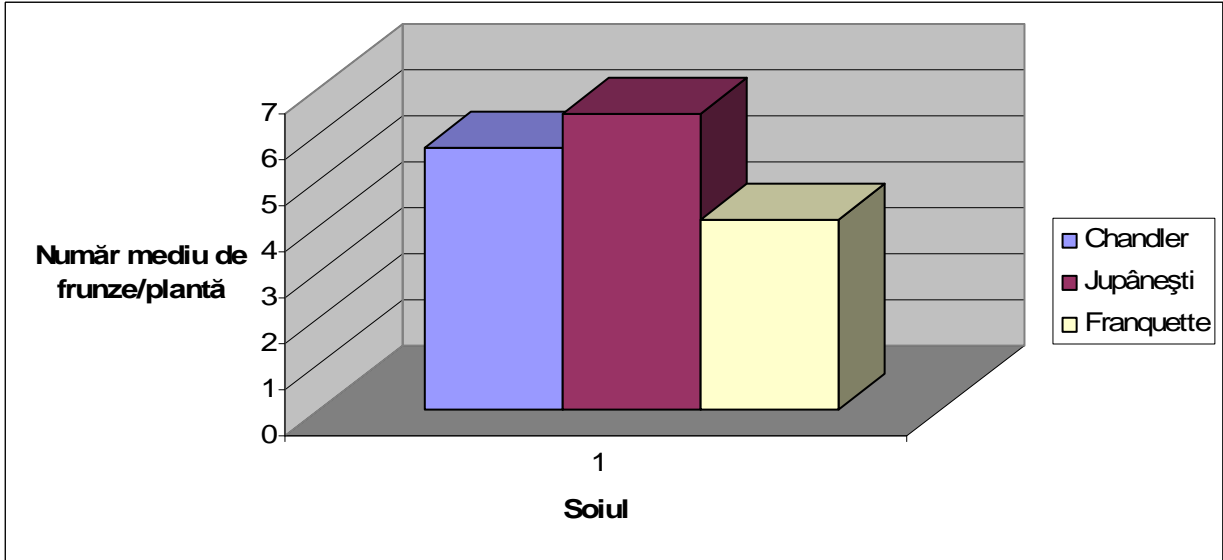


Fig. 10. Numărul mediu de frunze/plantă după tratamentul cu Promalin
 Fig. 10. Average number / plant after Promalin treatment

În ceea ce privește numărul mediu de frunze/plantă, la plantele tratate cu Promalin, cel mai mare număr mediu de frunze/plantă a fost înregistrat la soiul Jupânești, respectiv 6.4 ± 0.4 , iar cel mai mic număr mediu de frunze/plantă a fost înregistrat la soiul Franquette, respectiv 4.10 ± 0.5 .

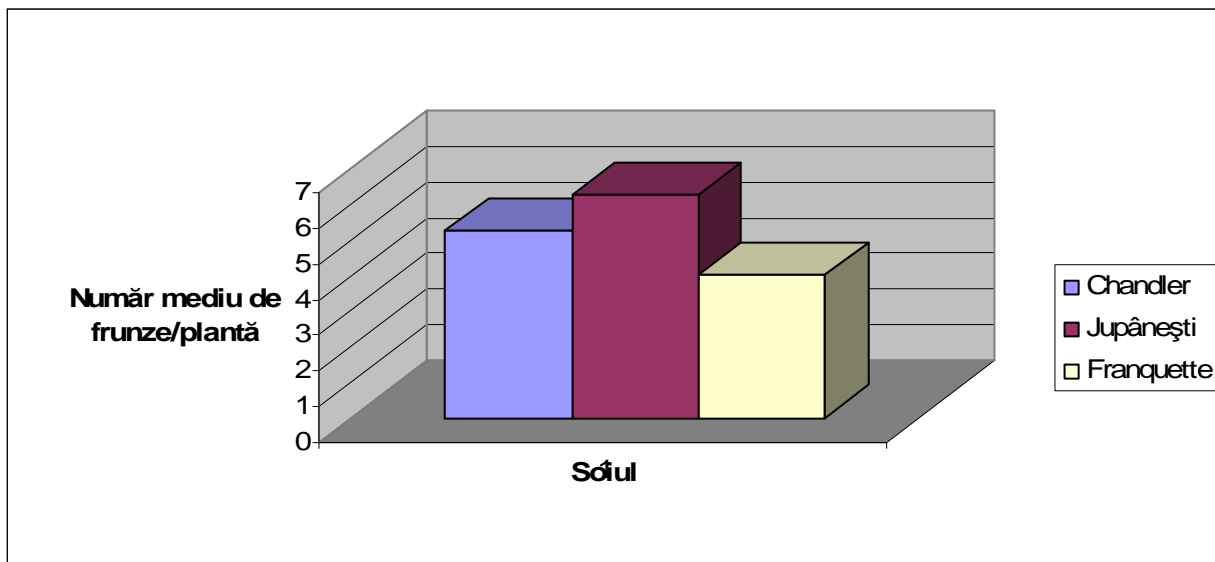


Fig. 11. Numărul mediu de frunze/plantă după tratamentul cu Dormex

Fig. 11. Average number / plant after Dormex treatment

În cazul plantelor tratate cu Dormex, cel mai mare număr mediu de frunze/plantă a fost înregistrat la soiul Jupânești, respectiv 6.25 ± 0.25 , iar cel mai mic număr mediu de frunze/plantă a fost înregistrat la soiul Franquette, respectiv 4.

Din datele prezentate mai sus nu se poate spune cu certitudine că la scară mare se vor obține aceleași rezultate, dar cu siguranță se poate spune că, prin folosirea regulatorilor de creștere se va îmbunătăți dezvoltarea plantelor și în același timp se va evita blocarea creșterii apex-ului.

5.5 TRANSFERUL PLANTELOR DE NUC ÎN CÂMP DESCHIS

Etapa de transfer câmp a plantelor de nuc este un proces complex care a rămas la stadiul de analiză teoretică .

Pentru transferul plantelor în câmp deschis este necesară cunoașterea factorilor care condiționează reușita culturii și anume:

- existența terenului pentru plantarea puieților cu următoarele caracteristici: gradul de favorabilitate a zonei unde este amplasat terenul, expunere, tipul solului;
- cerințele solului: elemente nutritive, corectarea pH-ului solului dacă este necesar, nivelarea terenului dacă este cazul;
- nivelul mediu anual de precipitații, temperaturile medii anuale în zona unde este amplasat terenul;
- riscul culturii nucicole de expunere la boli și dăunători;
- efectuarea lucrărilor de plantare și întreținere;
- existența/inexistența posibilităților de desfacere pe piață în mod direct, fără intermediari, a produselor nucicole;

- menținerea unei legături permanente între latura științifică și cea practică, pentru ca, pe de o parte, să existe progresul științific, iar pe de altă parte să existe spațiul (pământul) de punere în practică a progresului științific.

Deoarece transferul și controlul ulterior al plantelor de nuc în câmp deschis presupune o muncă laborioasă, această etapă rămâne subiect deschis pentru alți cercetători sau viitori cercetători interesați în cultura nucului.

CAPITOLUL 6. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

Metoda de dezinfecție a materialului biologic s-a dovedit a fi foarte eficientă. Prin manipularea corespunzătoare a explantelor, s-au evitat riscurile de infecție externă.

În cazul în care puieții de la care se recoltează explantele de nuc nu sunt liberi de boli, în maxim două săptămâni de la inoculare se observă infecții pe mediul de cultură.

În acest caz, puieții de la care s-a recoltat materialul biologic s-au dovedit a fi liberi de boli.

Mediul de cultură DKW cu 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l AIB și 2.1 g/l Phytigel a constituit cea mai bună variantă pentru realizarea stabilizării explantelor.

Cele mai bune rezultate s-au înregistrat pentru soiul românesc Jupânești, fiind confirmate rezultatele obținute de Catita Șarpe și prezentate în teza sa de doctorat în anul 2002.

Mediul de cultură în care s-au folosit perlele de tapioca s-a dovedit eficient în stabilizarea explantelor de nuc.

Și în această variantă de mediu, cu soiul Jupânești s-au obținut cele mai bune rezultate în etapa de stabilizare a culturilor.

Tapioca, din punctul de vedere al rentabilității economice este de 40-50 de ori mai ieftină decât agarul.

Mediul de cultură poate fi foarte bine îmbunătățit din punct de vedere ionic prin folosirea perlelor de tapioca, prin aceasta realizându-se o bună rată a diviziunii celulare după cum menționează (Endale and Santhanarayana, 2001).

Pentru inducerea înrădăcinării am folosit mediu de cultură MS cu auxină (AIB) în concentrație de 3 mg/l. Perioada de inducție a fost de 8 zile și temperatura din camera de creștere a fost de 22°C.

Pentru înrădăcinarea *in vitro* propriu-zisă a plantelor de nuc s-a folosit o singură variantă de mediu de cultură, perioada de timp în care culturile au fost ținute la înrădăcinat fiind de 30 de zile.

Mediul de cultură pentru înrădăcinarea *in vitro* propriu-zisă a plantelor de nuc a constat dintr-un amestec format din: mediu de bază DKW fără regulatori de creștere și vermiculită Granutec E.

Soiul Jupânești s-a pretat cel mai bine pentru mediul de cultură specificat mai sus, obținându-se cea mai bună rată a înrădăcinării.

Înrădăcinarea bună a plantelor este condiționată de: alegerea unei variante optime a mediului de inducție, realizarea unui amestec corespunzător de mediu de cultură și vermiculită și de calitatea și proveniența materialului biologic folosit.

Vermiculita în amestec cu mediul DKW, în proporții corespunzătoare, asigură un echilibru bun între oxigen și apă, iar capacitatea de penetrare a substratului este mult îmbunătățită.

Oxigenul are rolul de a îmbunătăți capacitatea de aerare a mediului de înrădăcinare, iar conținutul de apă asigură o umiditate corespunzătoare, fapt confirmat și de (Jayallemand, Capelli, 1992).

De asemenea, de echilibrul dintre componentele substratului de cultură (vermiculită și mediu DKW) depinde și gradul de disponibilitate al carbohidraților pentru dezvoltarea sistemului radicular (Haissig, 1982; Jay Allemand and Cornu, 1986; Jayallemand, Capelli, 1992).

În etapa de aclimatizare, folosirea substratului Steckmedium, s-a dovedit a fi foarte eficientă. În cadrul acestei etape plantele s-au dezvoltat în condiții de lumină naturală, iar nivelul temperaturii și al umidității au fost controlate.

Intervalul de temperatură asigurat pentru plantele puse la aclimatizat în seră a fost de 22-24°C, iar nivelul umidității a fost de 100%.

Pentru transferul în câmp este necesar ca plantele de nuc să aibă un sistem radicular bine dezvoltat și o bună capacitate autotrofă.

Din lisă de spațiu și timp, etapa de transfer a plantelor în câmp rămâne un subiect deschis care necesită a fi îmbunătățit.

BIBLIOGRAFIE

1. Berros, B., et al., *Rooting studies on "in vitro" walnut tissues: aging effect*. International Walnut Meeting, 1993(311): p. 105-116.
2. Botu, I., *Lista soiurilor de nuc din Romania*. 2008.
3. Bourrain, L. *In vitro walnut micropropagation "Juglans regia L. application"*. in COST 873. 2009. Murcia, Spain.
4. Caboni, E. and C. Damiano, *In vitro propagation of walnut (Juglans regia L.): Critical factors for the induction of the rooting response*. Proceedings of the Fifth International Walnut Symposium, 2006(705): p. 329-333.
5. Cicek, A., et al., *A comparative economic analysis between walnut and its alternative crops in the region (a case study of Niksar-Tokat-Turkey)*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 605-616.
6. Cociu, V., et al., *Culturile nucifere*, ed. V. Cociu. 2003: Editura CERES, Bucuresti. 351.
7. Cociu, V., et al., *Nucul, alunul, castanul și alte culturi nucifere*. 2007: Editura CONPHYS. 133.
8. Collin, H.A. and S. Edwards, *Plant Cell Culture* ed. D.o.B.a.C. David Rickwood, et al. 1998 BIOS Scientific Publishers Ltd. 158.
9. Cornu, D. and C. Jay Allemand, *Micropropagation of Hybrid Walnut Trees (Juglans-Nigra X Juglans-Regia) through Culture and Multiplication of Embryos*. Annales Des Sciences Forestieres, 1989. **46**: p. S113-S116.
10. DolcetSanjuan, R., et al., *Micropropagation of walnut trees (Juglans regia L) and response to arbuscular mycorrhizal inoculation*. Agronomie, 1996. **16**(10): p. 639-645.
11. Driver, J., *Method for acclimatizing and propagating plant tissue culture shoots*. 1986, Plant Research Lab.
12. Driver, J.A., A.M. Kuniyuki, and R. Rodrigues, *In Vitro Propagation of Paradox Walnut Rootstock (Juglans Hindsii. J. Regia)*. ?, 1981. ?
13. Endale, G. and B.N. Santhanarayana, *Tapioca -A New and Cheaper Alternative to Agar for Direct in Vitro Shoot Regeneration and Microtuber Production from Nodal Cultures of Potato*. African Crop Science Journal, 2001. **9**(1): p. 1-8.
14. Frutos Tomas, D., *Diferenciacion floral en vergel de los cultivares de nogal (Juglans regia, L.) enraizados in vitro*. Actas de Horticultura 2003(39): p. 271-273.
15. Germain, E., J.P. Prunet, and A. Garcin, *Le noyer*. 1999: CTIFL FRANCE. 277.
16. Gruselle, R., N. Badia, and P. Boxus, *Walnut micropropagation: first results*. Acta Horticulturae 212, 1987: p. 511-515.
17. Gruselle, R. and P. Boxus, *Walnut Micropropagation*. First International Symposium on Walnut Production, 1990. **284**: p. 45-52.
18. Hacketta, W.P., C. Leslie, and G. McGranahanc, *Acclimatization of In Vitro Derived Plantlets of Walnut Rootstock Clones*. III International Symposium on

- Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, 2009(812): p. 427-430.
19. Haissig, B.E., *Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in Pinus bankasiana Lamb. cuttings*. For. Sci., 1982. **28**: p. 833-841.
 20. Hasey J., B.B. Westerdahl, and B.D. Lampinen, *Long-term performance of own rooted 'chandler' vs 'chandler' on paradox rootstock: the walnut research reports annual proceedings*. Sacramento, CA: The Walnut Marketing Board of California, 1999: p. 87-92.
 21. Hasey, J.K., et al., *Yield performance of own-rooted 'Chandler' walnut versus 'Chandler' walnut on Paradox rootstock*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 489-493.
 22. Jay Allemand, C. and D. Cornu, *Culture in vitro d'embryons isolés de noyer commun (Juglans regia L.)*. Ann. Sci. For., 1986. **43**: p. 189-198.
 23. Jayallemand, C., P. Capelli, and D. Cornu, *Root Development of Invitro Hybrid Walnut Microcuttings in a Vermiculite-Containing Gelrite Medium*. Scientia Horticulturae, 1992. **51**(3-4): p. 335-342.
 24. JayAllemand, C., et al., *Micropropagation of hybrid walnut trees: some factors involved in rooting*. International Walnut Meeting, 1993(311): p. 117-124.
 25. Kurtz, W.B. and H.E. Garrett, *Economic-Aspects of Eastern Black-Walnut Management*. First International Symposium on Walnut Production, 1990. **284**: p. 319-325.
 26. Leal, D., et al., *Micropropagation of Juglans regia L*, in *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. 2007. p. 381-390.
 27. Lopez, J.M., *Field behaviour of self-rooted walnut trees of different cultivars produced by tissue culture and planted in Murcia (Spain)*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 543-546.
 28. Lopez, J.M., *Walnut tissue culture: Research and field applications*. Black Walnut in a New Century, 2004. **243**: p. 146-152.
 29. Marques Silva, D.J. and J.S.D. Dias, *In vitro shoot culture on Juglans regia L.: repeated subculturing on juvenile and adult material*. Proceedings of the 3rd Intern. Walnut Congress, 1997: p. 251-256.
 30. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
 31. Navatel, J.C. and L. Bourrain, *Plant production of walnut Juglans regia L. by in vitro multiplication*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 465-471.
 32. Prunet, J.P. and T. Ginibre, *Comportement agronomique des nouveaux portegreffes CTIFL Juglans regia. Travaux de Recherche et d'expérimentation. Station Expérimentale de Creysse*. 2000.
 33. Rai, M.K., *Current advances in mycorrhization in micropropagation*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2001. **37**(2): p. 158-167.

34. Rguez. Tarrazo, A., J. Ignacio de Sebastian, and M. Angeles Revilla, *Influence of the phenological state of field grown walnut buds on their in vitro establishment*. International Walnut Meeting, 1993(311): p. 153-159.
35. Rios, D.G., et al., *Rooting responses in relation with PO, PPO and IAA-o activities on walnut (Juglans regia L) explants*. Third International Walnut Congress, 1997(442): p. 241-249.
36. Rodriguez, R., et al., *Simultaneous shoot-bud development on walnut tissues of different ages. macromorphological and histological analyses*. International Walnut Meeting, 1993(311): p. 141-152.
37. Saadat, Y.A. and M.J. Hennerty, *The effects of different in vitro and ex vitro treatments on the rooting performance of Persian walnut (Juglans regia L.) microshoots*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 473-480.
38. SARPE, C., *PhD Thesis, Researches regarding in vitro multiplication of walnut and chesnut*. 2002.
39. Sestras, R., *Ameliorarea speciilor horticole*. 2004: AcademicPres, Cluj-Napoca. 334.
40. Sharifian, S., et al., *Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured Persian walnut*. Acta Horticulturae, 2009. **III IS Acclim. and Establ. of Micropropagated Plants**(812).
41. Siebert, J.B., *Economic and policy considerations in marketing walnuts*. Acta Horticulturae 311, 1993: p. 249-255.
42. Tetsumura, T., K. Tsukuda, and K. Kawase, *Micropropagation of Shinano walnut (Juglans regia L.)*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2002. **71**(5): p. 661-663.
43. Vahdati, K., et al., *Rooting and acclimatization of in vitro- grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars*. 2004.
44. Zamani, Z. and K. Vahdati, *Influence of carbohydrate form and nitrogen source on growth of Persian walnut shoots in vitro*. Proceedings of the Fourth International Walnut Symposium, 2001(544): p. 537-541.



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ

Calea Mănăstur 3-5, 400372, Cluj-Napoca
Tel: 0264-596384, Fax: 0264-593792
www.usamvcluj.ro



Diplomat engineer
Rodica FLUTUR

***In vitro* micropropagation of the
common walnut (*Juglans regia* L.) and
her importance for the breeding and
the culture of the specie**

Summary of the PhD Thesis

Supervisors:
Prof. Dr. Radu SESTRĂȘ
Prof. Dr. Kourosch VAHDATI

Cluj-Napoca
2012

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION.....	3
CHAPTER 1. CURENT STAGE OF THE RESEARCHES	4
1.1 ECONOMIC, ALIMINARY AND CULTURAL IMPORTANCE OF THE SPECIES JUGLANS REGIA L.	4
1.1.1. <i>Economic importance</i>	4
1.1.2. <i>Alimentary importance</i>	4
1.1.3. <i>Cultural importance</i>	5
1.2 HISTORIC AND ORIGIN	5
CHAPTER 2. IN VITRO MICROPROPAGATION OF COMMON WALNUT J. REGIA L. AND THEIR IMPORTANCE IN CULTURE AND BREEDING OF THE SPECIES	7
2.1 THE CURRENT STAGE OF THE RESEARCH OF THE IN VITRO MICROPROPAGATION OF COMMON WALNUT (J. REGIA L.)	7
2.2 ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF THE IN VITRO MICROPROPAGATION OF COMMON WALNUT	9
2.3 THE IMPORTANCE FOR BREEDING OF THE IN VITRO MICROPROPAGATION OF COMMON WALNUT	11
CHAPTER 3. FRAMEWORK AND RESEARCH OBJECTIVES.....	12
3.1 PARTICULARITIES AND ASPECTS FROM THE EXPERIMENTAL AREA	12
3.2 PROPOSED OBJECTIVES.....	14
CHAPTER 4. BIOLOGICAL MATHERIAL AND WORKING METHOD.....	16
4.1 BIOLOGICAL MATERIAL.....	16
4.2 THE WORKING METHOD.....	16
4.2.1. <i>Culture media preparation</i>	16
4.2.2. <i>Microcuttings establishment</i>	16
4.2.3. <i>Microshoots multiplication</i>	17
4.2.4. <i>In vitro rooting of microshoots</i>	17
4.2.4.1 The rooting induction.....	17
4.2.4.2 The rooting stage.....	17
4.2.5. <i>The stage of greenhouse acclimatization of plantlets</i>	18
CHAPTER 5. RESULTS AND DISCUSIONS	19
5.1 THE STAGE OF IN VITRO STABILIZATION OF MICROCUTTINGS	19
5.1.1. <i>Results regarding the influence of genotype and gelling agent on the length of microshoots</i>	21
5.1.2. <i>Results regarding the influence of genotype and gelling agent on the length of microshoots</i>	23
5.2 THE STAGE OF IN VITRO MULTIPLICATION OF MICROSHOOTS.....	23
5.2.1. <i>Results regarding the influence of the genotype and cytokinin concentration on the microshoots number</i>	24
5.2.2. <i>Results regarding the influence of the genotype and citochynin concentration on the microshoots height</i>	26
5.2.3. <i>Results regarding the influence of the genotype and cytokinin concentration on the leaves number /microshoot</i>	28
5.2.4. <i>Results regarding the influence of the genotype and cytokinine concentration on the leaves length /microshoot</i>	30
5.3 THE STAGE OF THE <i>IN VITRO</i> ROOTING OF WALNUT PLANTLETS	30
5.3.1. <i>The importance of temperature, carbohydrates, auxine and the period of induction for the rooting of plants</i>	30
5.3.2. <i>Results regarding the influence of the genotype on the rooting of walnut plantlets</i>	30
5.4 THE STAGE OF GREENHOUSE ACCLIMATIZATION OF WALNUT PLANTLETS	33
5.5 THE TRANSFER OF WALNUT PLANTLETS IN OPEN FIELD	37
CHAPTER 6. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....	39
BIBLIOGRAPHY.....	41

INTRODUCTION47
PROPOSED OBJECTIVES48
CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS48

INTRODUCTION

The Ph.D thesis entitled „*In vitro* micropropagation of the common walnut (*Juglans regia* L.) and its importance for the breeding and culture of the specie” has as a principal objective the enrichment of the knowledge’s about *in vitro* multiplication of common walnut, presently known in Romania, and the highlighting of the importance of walnuts obtained trough this method for the breeding of the species.

The motivation for choosing this topic is due to my desire to learn more about this valuable species of economically and culturally interest.

As a species originating in Persia (actually the Islamic Republic of Iran), choosing this theme was a great opportunity to make some research even in the country of origin of the common walnut (*J. regia* L.). Thus, some of the results presented in this thesis were obtained in the laboratory of the Faculty of Horticulture in the College Abouraihan, University of Tehran in Iran under the guidance of Prof. Dr. Kourosh Vahdati, scientific leadership in cotutela.

The *in vitro* multiplication of common walnut is a complex method through all the steps that must be taken in the laboratory, respectively: initiation of the culture, culture establishing, multiplication and plants rooting. The complexity of this method is not only due to the difficulty of execution of these operations, but especially in the sensitivity that the introduced walnut explants present into the *in vitro* environment.

In this study, for the *in vitro* multiplication of common walnut we used microcuttings from three cultivars (Chandler, Franquette and Jupânești).

DKW culture medium (Driver, 1986) was used in the establishment stage and for the multiplication of the crops, and for the rooting induction stage I have used MS medium (Murashige și Skoog).

In the esthablishment stage I have used three diferent gelling agents (2,1 g/l Phytigel, 2,2 g/l Gelrite and 10 g/l agar), auxin (0,1 mg/l IBA), cytokinine (1 mg/l BAP) and 3 % sucrose.

For the multiplication of cultures I have used three diferent BAP concentrations: 0,5 mg/l, 1 mg/l and 1,2 mg/l.

For the rooting induction I have used IBA in concentration of 3 mg/l and the plants were kept in the dark for 8 days.

At the rooting stage I have used the vermiculite offred by the society „Comptoir de Minéraux et Matières Premières” from France, and the product Steckmedium was used for the aclimatisation of plants in the greenhouse, and it was offered by the company „Klasmann Deilmann” from Germany.

In this thesis we performed a preliminary study about the influence of alternative gelling agents (cassava and tapioca flour) to stabilize walnut crop. This type of gelling agents are currently used successfully in the micropropagation of other species. Materials for this study was obtained from Dr. Vandana Kumar, professor in the College of Forestry and Agriculture of India and Prof. K. Sylvestre Bakoh from Yaounde, Cameroon.

In 2012, the College of Abouraihan was declared Center of Excelence for the walnut research in Iran.

PROPOSED OBJECTIVES

The objective of this research is to improve the known techniques of micropropagation and multiplication by adapting existing protocols to the genotypes from the national and international assortment.

These methods are very little used by research institutions in the country, or used without effective results compared to the progress made in this field by international research institutions.

The specific objectives of the research are:

- selection, for the *in vitro* multiplication of walnut cultivars and local productive clones, easily adaptable to soil conditions, climate and resistant to disease and pest attack;
- the stabilisation of the phenolic compounds as a result of interventions performed on plant material used for multiplication;
- achieving a multiplication rate as good as possible;
- the production of new plants free of disease;
- achieving a good acclimatization protocol for the new plants;
- obtaining quality plants that will be a starting point for the breeding process.
- obtain viable results to represent a reference point for further researches and for professionals in nursery domain.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

Desinfection method of the biological materials has proven to be very effective. Also, by the proper handling of explants were avoided external infection risks.

If the seedlings from which walnut explants are harvested are not free of disease within two weeks after inoculation the infection is observed in the culture medium.

In our case, the seedlings from which was collected the samples has proven to be free of diseases.

DKW culture medium with 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA and 2.1 g/l Phytigel was the best option for achieving the establishment of the explants.

The best results was obtained for the romanian cultivar Jupânești, being confirmed by those obtained by Catita Șarpe and presented in his Ph.D thesis in 2002.

The culture medium with tapioca pearls has proven to be efficient in the walnut explant stabilisation.

For this version of culture medium, with Jupânești cultivar I have obtained the better results for cultures establishment.

Tapioca, in terms of economic return is 40-50 times cheaper than agar.

The culture medium may well be improved in terms of ionic compounds, by using tapioca pearls, thereby achieving a good rate of cell division as mentioned by (Endale and Santhararayana, 2001).

For the rooting induction I have used MS culture medium with auxin (IBA) in concentration of 3 mg/l. Induction period was 8 days and the temperature from growing chamber was 22°C.

With the Jupânești cultivar I have obtained the best results on the medium specified above, with the highest rate of rooting.

A good rooting of plants is conditioned by: the choice of optimal variants induction environment, achieving an appropriate mixture of culture medium and vermiculite and the quality and origin of biological material used.

DKW medium mixed with vermiculite in the proper proportions, strikes a good balance between oxygen and water, and substrate penetration ability is greatly improved.

Oxygen is used to improve aeration capacity of the rooting environment and water content ensures adequate moisture, as confirmed by (Jayallemand, Capelli, 1992).

Also, the equilibrium between culture substrate components (vermiculite and DKW medium) depends on the disponibility degree of carbohydrates for the development of the rooting system (Haissig, 1982; Jay Allemand and Cornu, 1986; Jayallemand, Capelli, 1992).

In the acclimatization stage, the use of the Steckmedium, has been proven to be very efficient. At this stage the plants have grown under natural light and temperature and humidity levels were controlled.

Temperature range assured for the acclimated plants in the greenhouse was 22-24oC and the humidity was 100%.

For the field transfer is required that the walnut plants have a well developed root system and a good autotrophic capacity.