

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
CLUJ-NAPOCA**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI**

**DOMENIUL DE DOCTORAT: HORTICULTURĂ**

**SPECIALIZAREA: FLORICULTURĂ ȘI ARBORICULTURĂ  
ORNAMENTALĂ**

**Biolog MARIN CĂPRAR**

**[REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT]**

**CERCETĂRI PRIVIND DIVERSITATEA GENETICĂ ȘI  
TEHNOLOGIA DE CULTURĂ ÎN SISTEM NEPROTEJAT LA  
GENUL *RHODODENDRON* ÎN CONDIȚIILE ECOCLIMATICE  
DIN TRANSILVANIA**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC**

**Prof. univ. dr. MARIA CANTOR**

**CLUJ-NAPOCA**

**2014**

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU</b>	
<b>CAPITOLUL I. IMPORTANȚA ȘI STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>PRIVIND CULTURA GENULUI <i>RHODODENDRON</i> .....</b>	<b>5</b>
1.1. IMPORTANȚA ECONOMICĂ ȘI CULTURALĂ A GENULUI <i>RHODODENDRON</i> .....	5
1.2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND CULTURA	
RHODODENDRONILOR PE PLAN INTERNAȚIONAL .....	6
1.3. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII PRIVIND CULTURA RHODODENDRONILOR PE	
PLAN NAȚIONAL .....	7
1.4. UTILIZAREA RHODODENDRONILOR ÎN SCOP ORNAMENTAL .....	8
1.5. UTILIZAREA RHODODENDRONILOR ÎN SCOPURI MEDICINALE ȘI COSMETICE .....	12
1.6. ALTE ÎNTREBUINȚĂRI ALE RHODODENDRONILOR .....	13
1.7. CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA FILOGENIEI ȘI TAXONOMIEI MOLECULARE ....	13
1.8. ETAPELE ANALIZEI DATELOR FILOGENETICE .....	19
<b>CAPITOLUL II. ORIGINEA, EVOLUȚIA ȘI ÎNCADRAREA SISTEMATICĂ</b>	
<b>A GENULUI <i>RHODODENDRON</i> .....</b>	<b>25</b>
2.1. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA GENULUI .....	25
2.2. RĂSPÂNDIREA ȘI PARTICULARITĂȚILE ECOLOGICE ALE	
GENULUI <i>RHODODENDRON</i> .....	28
2.2.1. Răspândirea pe plan internațional.....	28
2.2.2. Răspândirea în țara noastră .....	31
2.3. CLASIFICAREA BOTANICĂ .....	33
<b>CAPITOLUL III. TEHNOLOGIA DE CULTURĂ LA GENUL</b>	
<b><i>RHODODENDRON</i> .....</b>	<b>39</b>
3.1. FACTORII DE MEDIU .....	39
3.1.1. Temperatura .....	40
3.1.2. Lumina .....	42
3.1.3. Apa .....	44
3.1.4. Umiditatea atmosferică .....	45
3.1.5. Reacția solului și textura .....	45
3.1.6. Altitudinea, microrelieful și expoziția .....	46
3.2. METODELE DE ÎNMULȚIRE PRACTICATE LA GENUL <i>RHODODENDRON</i> .....	47

3.2.1. Înmulțirea prin semințe .....	47
3.2.2. Înmulțirea vegetativă .....	49
3.2.3. Înmulțirea prin micropropagare <i>in vitro</i> .....	53
3.3. ASPECTE TEHNOLOGICE SPECIFICE CULTURII DE RHODODENDRON .....	55
3.3.1. Înființarea culturilor .....	55
3.3.2. Lucrări de îngrijire cu caracter general .....	56
3.3.3. Lucrări de îngrijire cu caracter special .....	58
<b>CAPITOLUL IV. MARKERI MOLECULARI UTILIZAȚI ÎN FILOGENIA ȘI TAXONOMIA PLANTELOR .....</b>	<b>60</b>
4.1. MODUL DE MOȘTENIRE A GENOMULUI NUCLEAR LA PLANTE .....	61
4.2. ORGANIZAREA ȘI MODUL DE MOȘTENIRE A GENOMULUI MITOCONDRIAL LA PLANTE .....	62
4.3. ORGANIZAREA ȘI MODUL DE MOȘTENIRE A GENOMULUI PLASTIDIAL LA PLANTE	63
4.4. PRINCIPALELE CATEGORII DE MARKERI MOLECULARI UTILIZATE LA PLANTE .....	63
4.5. METODE DE DETECȚIE A MARKERILOR MOLECULARI ADN .....	66
<b>PARTEA a-II-a CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	
<b>CAPITOLUL V. SCOPUL, OBIECTIVELE, MATERIALELE ȘI METODELE DE CERCETARE .....</b>	<b>69</b>
5.1. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR .....	69
5.1.1. Obiectivele cercetărilor privind îmbunătățirea tehnologiei de cultură la studiate .....	70
5.1.2. Obiectivele cercetărilor privind analize de taxonomie moleculară la studiate .....	71
5.2. MATERIALUL BIOLOGIC, METODA DE LUCRU ȘI ORGANIZAREA EXPERIENȚELOR PRIVIND TEHNOLOGIA DE CULTURĂ .....	72
5.2.1. Materialul biologic utilizat .....	72
5.2.2. Organizarea și amplasarea experiențelor privind înmulțirea generativă .....	84
5.2.3. Organizarea și amplasarea experiențelor de butășire .....	94
5.2.4. Organizarea și amplasarea experiențelor privind adaptarea unor specii la condițiile climatice .....	97
5.3. MATERIALUL BIOLOGIC, METODA DE LUCRU ȘI ORGANIZAREA EXPERIENȚELOR PRIVIND STUDIILE DE TAXONOMIE MOLECULARĂ .....	99
5.3.1. Strategia de recoltare a materialului biologic .....	104
5.3.2. Extracția ADN-ului .....	106

5.3.3. Verificarea și cuantificarea acizilor nucleici prin metoda spectrofotometrică și prin electroforeză .....	112
5.3.3.1. <i>Metoda spectrofotometrică de cuantificare a ADN –ului</i> .....	112
5.3.3.2. <i>Electroforeza în gel de agaroză. Protocoale de electroforeză</i> .....	113
5.3.4. Tehnica PCR .....	116
5.3.5. Utilizarea unor markeri tip „COD DE BARE” capabili să diferențieze speciile între ele .....	123
5.3.6. Secvențierea probelor .....	124
5.3.7. Analiza datelor .....	125
<b>CAPITOLUL VI. CARACTERIZAREA FACTORILOR DE MEDIU DIN ZONA EXPERIMENTALĂ .....</b>	<b>126</b>
6.1. AȘEZARE GEOGRAFICĂ .....	126
6.2. FACTORII CLIMATICI .....	128
6.2.1. Temperatura .....	128
6.2.2. Lumina .....	131
6.2.3. Precipitațiile .....	132
6.2.4. Umiditatea atmosferică .....	135
6.3. FACTORII EDAFICI .....	136
6.3.1. Reacția solului, pH-ul și textura .....	136
6.4. CONCLUZII ASUPRA STUDIULUI PEDOCLIMATIC .....	137
<b>CAPITOLUL VII. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....</b>	<b>139</b>
7.1. REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND ÎMBUNĂTĂȚIREA TEHNICILOR DE CULTURĂ LA SPECIILE STUDIATE .....	139
7.1.1. Rezultate privind adaptarea la temperaturi scăzute .....	139
7.1.2. Rezultate obținute în experiențele de înmulțire și interpretarea acestora .....	141
7.1.2.1. <i>Rezultate privind influența modului de păstrare a semințelor în             ceea ce privește germinația acestora</i> .....	141
7.1.2.2. <i>Rezultate privind influența substratului privind dezvoltarea plantelor</i> .....	144
7.1.2.3. <i>Rezultate privind influența combinată a biostimulatorilor și a             substraturilor de înrădăcinare asupra înrădăcinării butașilor de rhododendron</i> .....	155
7.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND ANALIZE DE TAXONOMIE MOLECULARĂ LA SPECIILE STUDIATE .....	166
7.2.1. Rezultate privind adaptarea la temperaturi scăzute .....	166
7.2.2. Rezultate referitoare la analiza PCR .....	171
7.2.3. Rezultate referitoare la analiza secvențierii .....	177
7.2.4. Discuții referitor la arborii filogenetici rezultați .....	178

7.2.5. Discuții: Identificarea unor markeri moleculari “barcode” capabili să diferențieze speciile de <i>Rhododendron</i> între ele .....	183
<b>CAPITOLUL VIII. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI .....</b>	<b>184</b>
8.1. CONCLUZII PRIVIND ÎMBUNĂTĂȚIREA TEHNICILOR DE CULTURĂ LA GENUL <i>RHODODENDRON</i> .....	184
8.2. CONCLUZII PRIVIND UTILIZAREA MARKERILOR MOLECULARI ÎN TAXONOMIA MOLECULARĂ LA GENUL <i>RHODODENDRON</i> .....	185
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>188</b>
<b>INDEX ALFABETIC AUTORI .....</b>	<b>202</b>
<b>LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE, CU SUBIECT DIN TEZĂ .....</b>	<b>209</b>
<b>REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT ÎN LIMBA ROMÂNĂ ȘI ENGLEZĂ .....</b>	<b>211</b>

În contextul actual în care o problemă majoră a civilizației contemporane este protecția, conservarea și ameliorarea mediului înconjurător se impune stimularea interesului pentru aducerea naturii în mediul nostru de viață și mai ales a vegetației lemnoase, cu imensele sale servicii pe care adesea le ignorăm - ameliorarea climatului și atmosferei urbane - la care se adaugă frumusețea de neînlocuit pe care o aduc habitatului uman arborii și arbuștii.

Teza de doctorat intitulată **”CERCETĂRI PRIVIND DIVERSITATEA GENETICĂ ȘI TEHNOLOGIA DE CULTURĂ ÎN SISTEM NEPROTEJAT LA GENUL *RHODODENDRON* ÎN CONDIȚIILE ECOCLIMATICE DIN TRANSILVANIA”** urmărește să contribuie la îmbunătățirea tehnologiei de cultivare în scop peisagistic a speciilor de *Rhododendron* adaptate în condițiile pedoclimatice și de utilizarea lor în amenajările peisagere.

Un alt obiectiv al tezei îl reprezintă identificarea unor markeri moleculari tip Barcode care reușesc să discrimineze în procent cât mai mare speciile de *Rhododendron* din Europa. Întrucât diferențele dintre caracterele morfologice care fac distincția dintre specii/subspecii sunt minore și pot fi urmarea unor polimorfisme individuale determinate de factorii de mediu și nu a unor diferențe interspecifice, s-a considerat oportună realizarea unor studii de genetică moleculară care să contribuie la elucidarea statutului lor taxonomic.

Un impediment taxonomic pentru sistematicieni, ecologiști de teren și biologi evoluționiști este de a identifica corect un eșantion de plante sau de animale într-un mod rapid, repetabil și cât mai precis. Această problemă a fost motivul principal pentru dezvoltarea unei noi metode pentru identificarea rapidă a oricărei specii bazate pe extragerea unei secvențe de ADN dintr-o mostră de țesut din orice organism.

Prin valorificarea progreselor din genetica moleculară, tehnologia de secvențiere și bioinformatică, Codul de bare ADN, permite utilizatorilor să recunoască rapid și precis specii de plante și animale cunoscute și de a prelua informații despre ele. De asemenea, are potențialul de a accelera descoperirea de noi specii nedescoperite până în prezent. Codul de bare ADN-ul a devenit un instrument vital pentru taxonomiști în contextul gestionării durabile a biodiversității întregii planete.

Genul *Rhododendron* cuprinde arbuști de o mare frumusețe și eleganță a înfloriri, specii și cultivari obținute prin hibridare, în număr foarte mare incluzând și azaleele. Pe bună dreptate numiți și „regii arbuștilor ornamentali” (Reylei, 2004), cu o răspândire pe patru continente, în jurul lor s-a dezvoltat o întreagă industrie în ultimii ani cum de altfel s-a dezvoltat o întreagă ramură horticolă privind producerea și comercializarea plantelor lemnoase ornamentale. Din păcate în România la ora actuală nu există nici o pepinieră specializată în producerea de rhododendroni la un nivel profesionist deși cererea pentru acest sortiment există. Majoritatea plantelor care există la noi sunt importate și de multe ori acestea nu sunt adaptate pentru a face față climei din România ceea ce duce la pierderi mari încă din primul an după plantare.

Rhododendronii și azaleele sunt mult mai exigenți în cerințele de cultură decât multe plante cultivate frecvent și astfel nu vor crește ușor în orice grădină.

Genul *Rhododendron* este unul foarte divers cu peste 1100 de specii ce vegetează natural în zone foarte diferite, începând din zona tropicală și până în zona montană înaltă, însă, cu unele modificări aduse locului și alegerea corectă a speciei și a cultivarului, majoritatea iubitorilor de flori se pot bucura de frumusețea acestor plante în grădinile lor.

Lucrarea de față este structurată pe 8 capitole, conține un număr de 201 pagini fără anexe și rezumatul tezei, în care se regăsesc 60 de tabele, 55 de figuri (din care 22 grafice, 33 foto).

Primele patru capitole constituie rezultatul unei ample documentări privind stadiul actual al cunoașterii privind genul *Rhododendron*, documentare ce s-a bazat pe articole științifice, tratate de specialitate, cărți și publicații, precum și pe vizitarea unor site-uri internet cu informații în domeniu. În acest sens, în primul capitol s-a trecut în revistă importanța economică și culturală a genului *Rhododendron* precum și utilizarea acestuia în amenajări peisagere, dar și rolul ecologic important pe care îl are în ecosistemele alpine. În al doilea capitol sunt tratate aspecte privind originea, evoluția și încadrarea sistematică a genului *Rhododendron*. În capitolul trei sunt prezentate aspecte privind tehnologia de cultură, cu menționarea principalilor factori de mediu care influențează cultura și utilizarea speciilor de *Rhododendron* în amenajări peisagere. În capitolul patru sunt tratați principalii markeri moleculari utilizați în filogenia și taxonomia plantelor. Tipurile variate de markeri

moleculari diferă în ceea ce privește principiul, metodologia și aplicațiile, ceea ce crează problema selectării markerului cel mai potrivit pentru rezolvarea temei de cercetare propuse.

În filogenetica plantelor, cel mai ridicat grad de încredere în arborii generați este dat de congruența dintre informațiile procurate de la cele trei genomuri: plastidial, nuclear și mitocondrial (Savolainen și Chase, 2003). Totuși, multe studii se bazează pe utilizarea informațiilor provenite de la un singur genom, o explicație posibilă fiind lipsa unor markeri genetici potriviți. Deoarece filogeniile intraspecifice clar rezolvate pe baza a mai multor sisteme de date independente sunt dificil de obținut și costisitoare, se ajunge la utilizarea a câtorva sisteme de markeri mai mult sau mai puțin optime, aceasta reprezentând un compromis între nivelul de variabilitate suficient de ridicat al markerilor și utilitatea lor pentru a rezolva genealogii clare (Eidosen și colab., 2007).

Un impediment taxonomic pentru mulți sistematicieni, ecologiști de teren, și biologii evoluționiști este de a determina identificarea corectă a unui eșantion de plante sau de animale într-un mod rapid, repetabil și de încredere. Această problemă a fost motivul principal pentru dezvoltarea unei noi metode pentru identificarea rapidă a oricărei specii bazate pe extragerea unei secvențe de ADN dintr-o mostră de țesut de la orice organism.

Codul de bare constă dintr-o secvență scurtă standardizată de ADN între 400 și 800 perechi de baze care, în teorie, pot fi ușor izolate și sunt caracteristice pentru toate speciile de pe planetă. Prin valorificarea progreselor în genetica moleculară, tehnologia de secvențiere și bioinformatică, Codul de bare ADN permite utilizatorilor recunoașterea rapidă și precisă a unor specii greu de diferențiat morfologic. De asemenea, are potențialul de a accelera descoperirea de noi specii. Codul de bare ADN a devenit un instrument vital nou pentru taxonomiștii care sunt implicați în studii de filogenie moleculară și sistematică.

Conceptul a fost aplicat la început pentru identificarea speciilor de animalele cu citocrom C oxidaza 1 sau regiunea genei CO1. După mai multe proiecții generale ale regiunilor genei în genomul plantei, trei plastide (*RbCl*, *MATK*, și *trnH-psbA*) și una nucleară (ITS) regiuni de gene au devenit codul de bare standard de alegere în cele mai multe investigații pentru plante.

Capitolul cinci prezintă scopul și obiectivele cercetărilor, precum și descrierea materialului biologic utilizat, programul experimental și metodele de cercetare aplicate.



## **Obiectivele cercetărilor privind îmbunătățirea tehnologiei de cultură la speciile studiate**

Deoarece prin rezultatele acestor cercetări se urmărește îmbunătățirea tehnologiei de producere a materialului săditor pe cale vegetativă și generativă a unor specii din genul *Rhododendron* precum și adaptarea acestor specii la condițiile climatice din Transilvania, obiectivele de cercetare au fost grupate astfel:

a) Obiective privind selectarea unor specii de *Rhododendron* capabile să vegezeze în condițiile de mediu din zonă:

- studii privind rezistența plantelor la temperaturile negative din iarnă și arșița din timpul verii;
- studii privind alegerea locului de plantare și a îmbunătățirii condițiilor pedologice.

b) Obiective privind înmulțirea generativă a speciilor de *Rhododendron* selectate și aclimatizate:

- studiul principalelor caractere calitative ale semințelor de rhododendron, viabilitatea și germinația;
- studiul influenței substratului de repicat asupra dezvoltării plantelor.

c) Obiective privind înmulțirea vegetativă a speciilor de *Rhododendron* luate în studiu:

- studiul influenței substratului de înrădăcinare asupra rizogenezei;
- studiul influenței biostimulatorilor asupra înrădăcinării.

## **Obiectivele cercetărilor privind analize de taxonomie moleculară la speciile studiate**

Obiectivul 1: Identificarea unor markeri moleculari “barcode” capabili să diferențieze cele patru specii de *Rhododendron* între ele.

Obiectivul 2: Investigarea relațiilor filogenetice dintre cele patru specii de *Rhododendron* ce vegează spontan în Europa.

Relațiile filogenetice dintre taxonii *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron myrtifolium*, *Rhododendron hirsutum* și *Rhododendron luteum* nu au fost anterior investigate prin procedee moleculare. Așadar, s-a considerat ca fiind oportună realizarea

unui studiu care să aibă ca obiectiv clarificarea statutului taxonomic a acestor specii respectiv *Rhododendron myrtifolium* (singura specie de *Rhododendron* din România) cu celelalte specii întâlnite în Europa Centrală, în special în munții Alpi și Pirinei.

Secvențele provenite de la 10 markeri moleculari: *ITS2*, *rpoC*, *trnH*, *accD*, *rpoB*, *ndhJ*, *matK*, *ycf 5*, *rbcL* și *ITS 12* au fost utilizate pentru amplificare PCR și secvențare, iar secvența *rpoC* pentru construcția de arbori filogenetici. Totodată s-a urmărit îmbunătățirea tehnicilor de izolare a ADN-ului la genul *Rhododendron*, un gen problematic datorită structurii frunzelor (Căprar și colab., 2014).

## **Materialul biologic utilizat**

### **Speciile testate privind rezistența la temperaturi negative**

Materialul biologic utilizat pentru realizarea experiențelor a fost obținut din sămânță, în urma schimbului internațional de semințe ce se desfășoară între Grădina Botanică Jibou și cele peste 300 de grădini botanice, arborete și alte instituții de profil din întreaga lume.

În acest sens s-au cerut semințe de la specii de *Rhododendron* după niște criterii bine stabilite referitoare la răspândirea geografică a acestora pe glob având în vedere vastul areal în care aceste specii vegetează. Astfel s-au selectat specii care în urma consultării literaturii de specialitate ar fi capabile să reziste neprotejate în condițiile climatice din Transilvania (Cullen, 2005; Tony, 2003). Rezistența la temperaturi scăzute este cel mai important criteriu pentru a evalua colecția de *Rhododendron* din Grădina Botanică Jibou.

Speciile de *Rhododendron* testate la Grădina Botanică Jibou*Rhododendron species tested at Botanical Garden Jibou*

Nr. Crt. No.	Specii Species	Sursa Source	Răspândirea naturală Natural spread	Comentarii Comments
1.	<i>Rhododendron thomsonii</i> Hooker	Bielefeld 1999	Himalaya, Vestul Chinei	Frunze persistente
2.	<i>Rhododendron yakushimanum</i> Nakai	Bielefeld 1999	Japonia	Frunze persistente
3.	<i>Rhododendron oreodoxa</i> Franchet	Tubingen 1999	Vestul Chinei	Frunze persistente
4.	<i>Rhododendron fortunei</i> Lindley	Bielefeld 1999	China	Frunze persistente
5.	<i>Rhododendron camtschaticum</i> Pallas	Tubingen 1999	Rusia (Estul Siberiei), China (Manchuria)	Frunze căzătoare
6.	<i>Rhododendron carolinianum</i> Rehde	Kaunas 1999	Nordul Carolinei, Tennessee	Frunze persistente
7.	<i>Rhododendron reticulatum</i> D. Don	Kyoto 1999	Sudul Japoniei, Coreea de Sud (Cheju)	Frunze persistente
8.	<i>Rhododendron ledebourii</i> Pojark.	Kaunas 1999	Siberia, Mongolia	Frunze persistente
9.	<i>Rhododendron poukhanense</i> H.Lev.	Bremen 1999	Coreea	Semi-căzătoare
10.	<i>Rhododendron luteum</i> (Linnaeus) Sweet	Berlin-D 1999	Din Europa de Est până în Caucaz	Frunze căzătoare
11.	<i>Rhododendron viscosum</i> (L.) Torr.	Bremen 1999	America de Nord	Frunze căzătoare
12.	<i>Rhododendron schlippenbachii</i> Maximowicz	Tubingen 1999	Korea, Estul Rusiei	Frunze căzătoare
13.	<i>Rhododendron prinophyllum</i> Millais	Bergen 1999	Canada	Frunze căzătoare
14.	<i>Rhododendron degronianum</i> Carrière	Kaunas 1999	Japonia	Frunze persistente
15.	<i>Rhododendron prunifolium</i> (Small) Millais	Tubingen 1999	Sud-Estul USA	Frunze căzătoare
16.	<i>Rhododendron canadense</i> (Linnaeus) Torrey	Tubingen 1999	Estul Americii de Nord	Frunze căzătoare
17.	<i>Rhododendron decorum</i> Franchet	Bremen 1999	Vestul Chinei	Frunze persistente
18.	<i>Rhododendron hemsleyanum</i> Wilson	Tubingen 1999	Vestul Chinei	Semi-căzătoare
19.	<i>Rhododendron schlippenbachii</i> Maximowicz	Jena 1999	Korea, Estul Rusiei	Frunze căzătoare
20.	<i>Rhododendron myrtifolium</i> Schott and Kotschy	Talin 1999	Europe de Est	Frunze persistente
21.	<i>Rhododendron albrechtii</i> Maximowicz	Bergen 1999	Japonia	Frunze căzătoare
22.	<i>Rhododendron sutchuenense</i> Franchet	Bremen 1999	Vestul Chinei	Frunze persistente
23.	<i>Rhododendron kiusianum</i> Makino	Jena 1999	Japonia	Frunze persistente
24.	<i>Rhododendron micranthum</i> Turczaninow	Tubingen 1999	Nordul Chinei, Coreea	Frunze persistente
25.	<i>Rhododendron caucasicum</i> Pallas	Bremen 1999	Turcia, Caucaz	Frunze persistente
26.	<i>Rhododendron catawbiense</i> Michaux	Bergen 1999	Estul USA	Frunze persistente
27.	<i>Rhododendron ponticum</i> Linnaeus	Tubingen 1999	Vestul zonei Mediteraneene	Frunze persistente

Alegerea speciilor de rhododendroni s-a făcut în urma unor studii făcute în perioada 2000-2010 când s-a urmărit adaptarea unor specii la condițiile climatice din zona Grădini Botanică Jibou, rezistența acestora la gerurile din iarna (-24°C) precum și la temperaturile ridicate din timpul verii (30-34°C), la care se adaugă și umiditatea aerului foarte scăzută (Căprar și colab., 2011).

Totodată au fost urmărite și alte obiective cum ar fi rezistența la boli și dăunători, creșterea și dezvoltarea plantelor, înflorirea și fructificarea acestora și bineînțeles efectul decorativ.

## Speciile utilizate în experiențele de înmulțire generativă și vegetativă

Pentru prezentul studiu s-au ales speciile care au dat cele mai bune rezultate și care în viitor pot fi utilizate în lucrările de ameliorare pentru obținerea unor hibrizi care să facă față cu succes condițiilor de mediu din zonă. Astfel au fost selectate 5 specii, două originare din Asia o specie din America de Nord și două din Europa.

Un alt criteriu ales a fost valoarea ornamentală deosebită a acestor plante.

### Materialul biologic utilizat în experiențe

#### *Biological material used in experiments*

Nr. Crt. No.	Specia <i>Species</i>	Răspândirea naturală <i>Natural spread</i>	Talia la maturitate (m) <i>Size at maturity (m)</i>	Culoarea florilor <i>The color of flowers</i>	Observații <i>Comments</i>
1.	<i>Rhododendron ponticum</i> Linnaeus	Vestul zonei Mediteraneene	1,5-2	mov	Frunze persistente
2.	<i>Rhododendron poukhanense</i> H.Lev.	Corea	0,5-1,2	mov	Frunze persistente
3.	<i>Rhododendron luteum</i> (Linnaeus) Sweet	Din Europa de Est până în Caucaz	1,5-2,5	galben	Frunze căzătoare
4.	<i>Rhododendron sutchuenense</i> Franchet	Vestul Chinei	2-3	roz	Frunze persistente
5.	<i>Rhododendron catawbiense</i> Michaux	Estul USA	2-3	roz	Frunze persistente

Toate speciile de *Rhododendron* alese ca și material biologic propus pentru înmulțire sunt plante cu vârsta cuprinsă între 7-12 ani, cu înălțimi în funcție de specie de până la 170 cm, care înfloresc și fructifică în fiecare an și rezistă foarte bine condițiilor meteo de aici.

### **Organizarea și amplasarea experiențelor privind înmulțirea generativă**

Experiențele programate în prezenta lucrare privind înmulțirea prin semințe s-au desfășurat în sera înmulțitor din complexul de sere expozițional și în răsadnițele care deserveșc sera de la Grădina Botanică “Vasile Fati” Jibou. Toate semințele au fost semănate în luna martie în sera înmulțitor din complexul de sere expoziționale ale grădinii botanice, sera în care s-au putut asigura condițiile optime de germinare, adică o temperatură de 20-24°C (Reiley, 2004) pe un substrat format din 70% turbă cernută și 30% perlit, în ghivece de

plastic cu diametrul de 14 cm, fiecare etichetate pentru a nu se pierde identitatea plantelor.

Un aspect important de care s-a ținut cont a fost umiditatea atmosferică, care trebuie să fie cuprinsă între 80-90%, acesta fiind și motivul pentru care toate ghivecele au fost acoperite cu folie de plastic până la apariția primelor plantule, când treptat au fost descoperite pentru aerisire. Mediul de cultivare trebuie să rețină bine umezeala, să fie bine drenat și să fie de o granulație suficient de fină pentru a permite o bună diseminare a semințelor pe o suprafață cât mai netedă.

Semințele germinează la lumină, deci nu au fost acoperite cu pământ. O folie sau sticlă s-a pus peste ghivece pentru a menține umiditatea.

### **Organizarea și amplasarea experiențelor de butășire**

Butașii folosiți în experiențele ce s-au făcut au fost butași simpli semilemnificați, specifici pentru foioasele persistente, ce au fost recoltați în luna august, de pe plante mature cu vârsta cuprinsă între 6 și 12 ani, bine adaptate condițiilor de mediu din zona și cu o dezvoltare corespunzătoare. Recoltarea s-a făcut cu foarfeca de vie și s-au folosit doar creșteri anuale laterale din partea inferioară a plantelor mamă. Lungimea butașilor diferă în funcție de specie. Baza butașilor se pregătește prin rănire adică scoaterea unei porțiuni mici de scoarță. Pentru variantele în care au fost utilizați biostimulatori, baza butașului a fost trecută printr-un recipient cu pudră, butașul fiind apoi scuturat pentru a se înlătura surplusul de substanță. În cazul biostimulatorilor lichizi baza butașului a fost imersată în soluție pentru o perioadă de timp de 24 de ore. Ca și substanțe biostimulatoare au fost folosite Radistim 2, Incit 8, ANA 0,01% (acid naftil acetic), AIB 0,01% (acid idolil butiric).

Substraturile de înrădăcinare au fost realizate din nisip, perlit, turbă, fibră de cocos și amestecuri ale acestora în raporturi de 1:1 pregătite în prealabil și care au fost așezate în tăvițe pentru butașit pe parapet în seră. Distanța dintre butași a fost de 3-4 cm pe rând, iar între rânduri de 5-6 cm. Adâncimea de plantare nu a fost mare, aproximativ de 2-4 cm pentru ca frunzele să nu atingă substratul de înrădăcinare.

Pentru a se obține rezultate satisfăcătoare, având în vedere că înmulțirea prin butășire la aceste plante este destul de dificilă, în sera unde s-au făcut experiențele s-au asigurat condiții prin realizarea instalației de ceață artificială care să asigure o umiditate relativă a

aerului între 80-90%, iar temperatura a fost de 20-24°C. Totodată pentru a se evita apariția ciupercilor sau a altor agenți fitopatogeni, s-au aplicat periodic tratamente fitosanitare cu fungicide cum ar fi Topsin 0,1%, Previcur 0,1%.

Experimentele s-au desfășurat pe parcursul a 2 ani (2011 și 2012), în seră, și s-a analizat influența a doi factori experimentali (patru biostimulatori și patru substraturi de înrădăcinare), la cinci specii de *Rhododendron*. Din combinația acestora au rezultate 16 variante experimentale, așezate în blocuri randomizate, în trei repetiții.

Speciile analizate au fost: *Rhododendron luteum* Sweet, *Rhododendron ponticum* L., *Rhododendron catawbiense* Mich., *Rhododendron poukhanense* Lev., *Rhododendron sutchuense* Franch.

#### **Factorul A – biostimulatorul de înrădăcinare**

a<sub>1</sub> – Radistim 2

a<sub>2</sub> – Incit 8

a<sub>3</sub> – A.I.B. - acid idolil butiric

a<sub>4</sub> – A.N.A. - acid naftil acetic

#### **Factorul B – substratul de înrădăcinare**

b<sub>1</sub> – fibră de cocos măcinată

b<sub>2</sub> – nisip + perlit (1:1)

b<sub>3</sub> – nisip + turbă (1:1)

b<sub>4</sub> – perlit + turbă (1:1)

Experiența este bifactorială de tipul 4 x 4, în care s-au folosit 20 de butași pentru fiecare variantă experimentală. Cei 20 de butași analizați au avut aproximativ aceeași mărime în cadrul fiecărei specii, pentru a evita apariția de erori foarte mari. S-au asigurat condiții climatice identice pentru toate variantele experimentale.

## **Materiale și metode**

- pentru testele de germinație s-au utilizat câte 50 de semințe pentru fiecare specie;
- în cadrul experiențelor privind influența substratului s-au folosit câte 10 plante în 3 repetiții;
- în cazul experiențelor de butășire s-au utilizat câte 20 de butași în 3 repetiții;
- interpretările statistice s-au făcut prin analiza varianței.

## **Speciile utilizate în experiențele privind studiile de taxonomie moleculară**

Cunoașterea habitatelor în care trăiesc speciile de *Rhododendron* devine un obiectiv important în vederea protejării acestor specii, în majoritatea țărilor europene aceștia fiind rari sau pe cale de dispariție. Totodată habitatele cu rododendroni adăpostesc o serie întreagă de specii rare și interesante din punct de vedere științific, de la martori ai glaciațiunilor până la specii supraviețuitoare din Terțiar sau endemisme unice.

În cadrul studiilor de taxonomie moleculară s-au ales patru specii de *Rhododendron* ce vegetează spontan în Europa din cele 7 existente (Tutin și colab., 1972). Speciile alese sunt: *Rhododendron ferrugineum* L., *Rhododendron hirsutum* L., *Rhododendron myrtifolium* Schott & Kotschy, *Rhododendron luteum* L.

Materialul biologic folosit la analize a fost recoltat în luna iunie, în anii 2011-2012 din mai multe locații din munții Alpi pentru speciile *Rhododendron ferrugineum* și *Rhododendron hirsutum*. Totodată în aceste zone s-au făcut și observații fitosociologice (Căprar și colab., 2014). Din rezervațiile Lendorf (Austria) și Kolacznia (Polonia) a fost recoltat material biologic pentru specia *Rhododendron luteum*. Probe de *Rhododendron myrtifolium* au fost luate din Munții Rodnei și Munții Piatra Craiului. S-a urmărit respectarea unei distanțe de câțiva metri între indivizi. S-au folosit frunze tinere sănătoase, fără pete de rugină sau alți paraziți, care au fost introduse imediat în tuburi pline cu silicagel. După prelevare frunzele au fost păstrate la -80°C până în momentul utilizării pentru izolarea ADN-ului.

## Locația, coordonatele geografice și anul recoltării

### *Location, geographic coordinates and harvesting year*

Nr. No.	Specia Species	Locatia Location	Altitudine (m) Altitude (m)	Coordonate Geografice Geographic coordinates	Data Date	Țara Country
1.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Breuil-Cervinia	2020	45°55'49"N/7°37'36"E	2011	Italia
2.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Breuil-Cervinia	1870	45°54'46,87"N/7°36,55'80"E	2011	Italia
3.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Großglockner	1900	47°03'45,12"N/12°49'22.17"E	2011	Austria
4.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Zumdorf	1530	46°36'03,91"N/8°80'49.77"E	2011	Elveția
5.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Klausen pass	1952	46°52'05,36"N/8°51'16.71"E	2011	Elveția
6.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Edelweisspitze	2002	47°07'24,53"N/12°48'38.11"E	2011	Austria
7.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Furka Pass	1720	46°35'21,11"N/8°29'27.58"E	2011	Elveția
8.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Furka Pass	1600	46°35'43,77"N/8°29'49"E	2011	Elveția
9.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Furka Pass	1920	46°35'15,80"N/8°29'01.42"E	2011	Elveția
10.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Flüela Pass	2100	46°44'42,73"N/9°59'24.87"E	2011	Elveția
11.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Flüela Pass	2000	46°46'50,92"N/9°55'32.92"E	2011	Elveția
12.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col d'Izoard	2270	44°49'21"N/6°43'53"E	2012	Franța
13.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col d'Izoard	2070	44°49'55"N/6°43'25"E	2012	Franța
14.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col du Galibier	2330	45°02'49"N/6°23'51"E	2012	Franța
15.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col du Glamdon	1590	45°15'18"N/6°11'20"E	2012	Franța
16.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col du Lautaret	2100	45°02'17"N/6°24'04"E	2012	Franța
17.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col de la Cayolle	2179	44°15'15"N/6°45'09"E	2012	Franța
18.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col de la Bonnette	2100	44°19'41"N/6°51'47"E	2012	Franța
19.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Val – d'Isere	2060	45°27'13"N/7°02'05"E	2012	Franța
20.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Petit Saint Bernand	2010	45°38'54"N/6°51'13"E	2012	Italia
21.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Col du Thule	2026	45°42'07"N/6°54'24"E	2012	Italia
22.	<i>Rh.hirsutum</i>	Klausen pass	1660	46°52'07"N/8°51'08"E	2012	Elveția
23.	<i>Rh.hirsutum</i>	Triglave	1650	46°23'41"N/13°58'24"E	2012	Slovenia
24.	<i>Rh.luteum</i>	Lendorf	670	46°50'07"N/13°25'24"E	2012	Austria
25.	<i>Rh.luteum</i>	Kolacznia	195	50°18'20N/22°16'73 E	2012	Polonia
26.	<i>Rh.myrtifolium</i>	Piatra Craiului	1948	45°34'255N/25°14 E	2012	România
27.	<i>Rh.myrtifolium</i>	Rodnei	1825	47°34'255N/24°35 E	2012	România
28.	<i>Rh.ferrugineum</i>	Pirinei	1900	42°34'255N/0°54 E	2012	Spania

### **Etapele parcurse privind analizele de taxonomie vegetală**

- izolarea ADN-ului celular din frunze;
- cuantificarea calitativă și cantitativă a ADN-ului prin electroforeză în gel de agaroză și Nanodrop;
- PCR cu amorse specifice;
- izolarea din gel a ampliconilor de succes;
- purificarea și cuantificarea produșilor de PCR;
- reamplificarea produsilor de PCR;
- purificarea și cuantificarea produșilor de PCR;



- secvențiere;
- arbori filogenetici.

În cadrul analizelor de taxonomie moleculară s-au utilizat programele Blast și Mega 6.

În capitolul șase se prezintă caracterizarea factorilor de mediu din zona experimentală după un studiu de peste 10 ani. În perioada când s-au desfășurat experiențele temperatura medie anuală a fost de 10,7°C cu 2,1°C mai mult decât media multianuală. Luna cea mai călduroasă a fost luna iulie, din anul 2003, când temperatura medie a fost de 24,1°C, iar luna cu cele mai mici temperaturi a fost luna ianuarie, din anul 2004, când temperatura medie a fost de -6,7°C. Temperatura maximă înregistrată a fost de 42°C în data de 27 iulie 2008, iar minima a fost de -24°C și a fost înregistrată în data de 15 ianuarie 2002.

Capitolul șapte tratează rezultate ale cercetărilor privind îmbunătățirea tehnicilor de cultură la speciile studiate cât și rezultate privind analizele de taxonomie moleculară la speciile studiate.

- astfel din cele 27 de specii care au fost testate timp de aproximativ 10 ani, 10 specii s-au adaptat condițiilor de mediu din cadrul Grădinii Botanice Jibou, acestea rezistând la o temperatură de -24°C. Dintre acestea opt specii sunt specii cu frunze persistente iar doua sunt specii cu frunze cazătoare.

Speciile de *Rhododendroni* care s-au adaptat condițiilor de mediu din

Grădina Botanică Jibou

*Rhododendron species that have been adapted to the environmental conditions of Botanical Garden Jibou*

Nr. Crt. No.	Specia <i>Species</i>	Inălțimea plantei (m) <i>Plant height (m)</i>	Culoarea florilor <i>Flowers color</i>	Perioada înfloririi – luna – <i>Flowering period – Month –</i>	Observații <i>Comments</i>
1	<i>Rhododendron thomsonii</i> Hooker	1,4	roșie	aprilie	Frunze persistente
2.	<i>Rhododendron poukhanense</i> H.Lev.	0,8	mov	aprilie-mai	Frunze semi-persistente
3.	<i>Rhododendron luteum</i> Swwet	1,4	galbenă	iunie	Frunze cazătoare
4.	<i>Rhododendron degronianum</i> Carrière	0,5	roz	mai	Frunze persistente
5.	<i>Rhododendron sutchuenense</i> Franchet.	1,7	roz	aprilie-mai	Frunze persistente
6.	<i>Rhododendron kiusianum</i> Makino	0,4	roz	mai-iunie	Frunze persistente
7.	<i>Rhododendron micranthum</i> Turczaninow	1,4	alb	iunie-iulie	Frunze persistente
8.	<i>Rhododendron caucasicum</i> Pallas	1.1	alb	aprilie-mai	Frunze persistente
9.	<i>Rhododendron catawbiense</i> Michaux	0,7	mov spre roz	mai	Frunze persistente
10.	<i>Rhododendron ponticum</i> Linnaeus	0,9	mov	iunie	Frunze persistente

Unele din aceste specii au fost aduse pentru prima dată în România și testate în condițiile climatice din Grădina Botanică Jibou iar rezultatele sunt încurajatoare, pe viitor pornind de la aceste specii precum și de la altele care vor mai fi testate aici se poate trece la următoarea etapă, respective hibridarea pentru a obține soiuri rezistente și în același timp cu mari valențe decorative.

- În ceea ce privește capacitatea de germinație a semințelor de *Rhododendron* procentul de germinație a semințelor a variat între 42% la specia *Rhododendron sutchuense* Franch și 81% la specia *Rhododendron poukhanense* Lev.

Această experiență a avut ca scop determinarea unor aspecte calitative a semințelor de rhododendron recoltate de la plante cultivate în Grădina Botanică Jibou în condițiile specifice climatului din Transilvania.

- Capacitatea semințelor de a-și păstra în timp însușirile lor biologice variază în limite largi, în funcție de specie, de calitatea inițială a lotului de semințe și de condițiile asigurate în perioada de depozitare;

- Datele arată o scădere accentuată a germinației semințelor păstrate la temperatura camerei la toate speciile din experiment, pe când între păstrarea la 4°C și -18°C nu există diferențe mari;

- Substratul de cultură influențează semnificativ înălțimimea plantelor, lungimea rădăcinilor și greutatea acestora. Se constată că în cazul speciei *Rhododendron luteum* Sweet. amestecul format din turbă + pământ de frunze + rumeguș (5:3:2) determină o diferență de creștere foarte semnificativă pozitivă față de martorul experienței. Plantele repicate în acest substrat au depășit plantele cultivate în turbă cu creșteri de 2.23 cm. Substratul format din turbă + nisip + pământ de frunze (4:3:3) generează diferențe de înălțime de 1,03 cm în comparație cu martorul. Această diferență este distinct semnificativă pozitivă și asigurată statistic.

- Hormonii de înrădăcinare au influențat pozitiv procentul de înrădăcinare a butașilor. Astfel în cazul speciei *Rhododendron ponticum* L., analizând datele, se observă că stimulatorii Incit 8, ANA și AIB influențează favorabil înrădăcinarea butașilor. Diferențele acumulate sunt foarte semnificative pozitive. Acești stimulatori au sporit numărul de butași înrădăcinați cu 20,5-31,1%.

- Studiind influența unilaterală a stimulatorului de înrădăcinare asupra numărului de butași înrădăcinați la *Rhododendron catawbiense* Mich., se constată că singurul stimulator care influențează favorabil înrădăcinarea este AIB. Diferențele înregistrate la numărul de butași sunt semnificative și pozitive (2,25). Acest stimulator a sporit numărul de butași înrădăcinați cu 17,4%

- Influența combinată a factorilor experimentali (stimulator și substrat de înrădăcinare) asupra numărului de butași înrădăcinați la *Rhododendron catawbiense* Mich. arată că combinația dintre AIB x nisip + turbă (1:1) duce la sporirea butașilor înrădăcinați cu 34,2%. Diferențele de 4,33 sunt distinct semnificative pozitive și asigurate statistic. Influența reciprocă dintre Incit 8 x nisip + perlit (1:1) și AIB x nisip + perlit (1:1) determină apariția diferențelor semnificativ pozitive (3,33 și 2.67). Se înregistrează diferențe pozitive și la alte combinații, însă neasigurate statistic.

- Prin adaptările proprii aduse kitului de la BIOLINE (Isolate plant DNA Mini Kit-Bioline) și utilizarea bilelor de oțel (steel beads) a dus la obținerea unor rezultate foarte bune în ceea ce privește cantitatea de ADN extras cât și calitatea acestuia, calitate verificată în experimentele efectuate ulterior (PCR). La specia *Rhododendron ferrugineum* concentrația ADN-ului a variat între 92 și 470 ng/μl, la specia *Rhododendron myrtifolium* concentrația ADN-ului extras a fost de 550 ng/μl pentru proba din Munții Piatra Craiului și 742,2 ng/μl pentru proba din Munții Rodnei. Și la specia *Rhododendron hirsutum* rezultatele au fost bune, concentrația fiind de 550,0 ng/μl pentru proba din Klausen Pass și 392,5 ng/μl pentru proba din Triglave-Munții Alpi. Rezultate suficient de bune s-au obținut și în cazul speciei *Rhododendron luteum* unde concentrația ADN-ului a fost de 63,4 ng/μl pentru proba din Lendorf (Austria) și 125,6 ng/μl pentru proba din Kolacznia (Polonia).

- Din cele zece perechi de amorse utilizate (*rpoC*, *ycf5*, *trnH*, *accD*, *rpoB*, *ndhJ*, *ITS1*, *ITS 2*, *matK*, *rbcL*) doar șase, respectiv *rpoC*, *ycf5*, *trnH*, *accD*, *rpoB* și *ndhJ* au funcționat la speciile *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron hirsutum* și *Rhododendron luteum*. În cazul celorlalte amorse s-au obținut benzi multiple, dovadă a amplificării unor produși nespecifici. La specia *Rhododendron myrtifolium* au funcționat următoarele amorse: *rpoC*, *ycf5*, *rbcL*, *accD*, *rpoB* și *ndhJ*. Acest lucru ne-a determinat ca pentru experiențele ulterioare să folosim numai aceste perechi de amorse.

- În urma secvențierii, singurul marker care a dat rezultate pozitive a fost markerul plastidial *rpoC* omologia dintre secvențele obținute a fost mai mare de 85%, indicând relații de filogenie apropiate între aceste specii. În cazul celorlalți markeri moleculari (*ycf5*, *trnH*, *accD*, *rpoB*, *ndhJ*, *rbcl*) rezultatul secvențierii a fost unul deficitar cu multe zone indefinite.

- Arborii filogenetici au fost construiți prin mai multe metode (Cap. V) folosind programul bioinformatic Mega 6. Suportul statistic a fost obținut folosind un bootstrap de 500 de replicare. Pentru a evalua puterea de discriminare a markerului *rpoC* în cadrul familiei *Ericaceae* și în cadrul genului *Rhododendron* s-au luat din baza de date a programului Blast secvențe de la specii din genul *Erica* (*Erica anguliger*, *Erica vestita*, *Erica discolor*, *Erica mammosa*) și specii din genul *Rhododendron* (*Rhododendron simsii*, *Rhododendron ponticum*).

- În cadrul arborelui realizat prin metoda ME se observă două grupări: prima ramură alcătuită din speciile din genul *Erica* ce se separă de ramura alcătuită din speciile din genul *Rhododendron* cu o valoare maximă de bootstrap și cea de-a doua ramură alcătuită din speciile din genul *Rhododendron* această grupare fiind clar delimitată și prin caractere morfologice. În cadrul celui de al doilea grup, subgruparea alcătuită din *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron myrtifolium* și *Rhododendron hirsutum* este unitară, cele trei specii fiind grupate în aceeași subsecție confirmând clasificarea sistematică clasică (Chamberlain și colab., 1996).

Lucrarea se încheie cu capitolul de concluzii și recomandări, care sintetizează toate rezultatele prezentate anterior. Câteva dintre recomandările formulate în capitolul opt, sunt amintite în continuare:

1. Capacitatea semințelor de a-și păstra un timp însușirile lor biologice variază în limite largi, în funcție de specie, de calitatea inițială a lotului și de condițiile asigurate în perioada de depozitare. Astfel, din experimentele făcute rezultă clar importanța modului de păstrare a semințelor pentru ca viabilitatea și germinația acestora să se păstreze un timp cât mai îndelungat, observându-se o scădere accentuată a germinației semințelor care sunt păstrate la temperatura camerei la toate speciile de *Rhododendron* din experiment, fața de păstrarea în frigider la 4°C și păstrarea în congelator la -18°C.

2. Substratul de cultura influențează semnificativ creșterea și dezvoltarea plantelor. Se constată că amestecul format din turbă + pământ de frunze + rumeguș (5:3:2) determină o diferență de creștere foarte semnificativă pozitivă față de martorul experienței. Plantele repicate în acest substrat au depășit plantele cultivate în turbă cu creșteri de 2,23 cm. Substratul format din turbă + nisip + pământ de frunze (4:3:3) generează diferențe de înălțime de 1,03 cm în comparație cu martorul turbă.

3. Azaleele și rhododendronii cresc cel mai bine într-un sol cu un pH cuprins între 4,6-6,0 (ideal pH 5,5), deoarece mineralele din sol sunt cel mai bine asimilate în acest interval. Un substrat adecvat pentru cultura rododendronilor este cel format din 40% turbă + 40% pământ de frunze + 20% nisip.

4. Utilizarea stimulatorilor de înrădăcinare Radistim 2, Incit 8, ANA 0,01% (acid naftil acetic), AIB 0,01% (acid idolil butiric) combinat cu alegerea unor substraturi optime duce la un procent de înrădăcinare semnificativ pozitiv.

5. Locul de plantare definitivă trebuie ales cu grijă, rododendronii fiind plante care se dezvoltă cel mai bine sub adăpostul altor arbori, la semiumbră.

6. Promovarea unor specii de *Rhododendron* care în urma testărilor făcute timp de peste 10 ani au reușit să se adapteze condițiilor de clima din zona Transilvaniei, rezistând la temperaturi negative de -24°C *Rhododendron ponticum* L., *Rhododendron luteum* Sweet, *Rhododendron catawbiense* Mich., *Rhododendron poukhanense* Lev., *Rhododendron sutchuense* Franch.

7. Pentru izolarea optimă a ADN-ului la speciile de *Rhododendron* luate în studiu (considerate specii "tari" datorită consistenței frunzei), s-a propus mărunțirea mecanică a materialului vegetal cu un omogenizator cu bile față de mojararea cu azot lichid, iar calitatea ADN-ului obținut este mai bună și mai ușor de realizat decât metoda clasică. Această metodă prezintă și un alt avantaj față de metoda de mojarare cu azot lichid eliminând deținerea unei surse permanente de azot lichid. În urma combinării celor două protocoale rezultatele privind calitatea și cantitatea ADN-ului izolat a fost foarte bună, ceea ce face ca pe viitor să poată fi utilizată cu succes această metodă.

8. Concentrația AND-ului izolat din diferite probe de rhododendron de la cele patru specii testate respectiv, *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron luteum*, *Rhododendron myrtifolium* și *Rhododendron hirsutum* prin protocolul cu adaptări proprii, s-a situat între

63,4 ng/μl la specia *Rhododendron luteum* și 747,2 ng/μl la specia *Rhododendron myrtifolium*, o cantitate suficientă pentru PCR.

9. În urma procesului de secvențare doar markerul *rpoC* a dat rezultate pozitive și a fost folosit în următoarea etapă de realizare a arborilor filogenetici pentru cele patru specii studiate.

În cadru genului *Rhododendron* se constată o grupare clară a speciilor *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron hirsutum* și *Rhododendron myrtifolium* în toate dendrogramele realizate ceea ce confirmă clasificarea botanică clasică, cele trei specii făcând parte din aceeași subsecție – *Rhododendron*.