

## Denumirea proiectului:

### APLICAREA SELECȚIEI RECURENTE SI MAS IN POPULAȚII HIBRIDE INTERSPECIFICE DE MAR, PENTRU CREAREA SOIURILOR ORNAMENTALE SI IDENTIFICAREA UNOR GENOTIPURI REZISTENTE LA ATACUL PRINCIPALELOR BOLI

Programul: **IDEI**  
Tipul proiectului: **Proiecte de cercetare exploratorie**  
Cod proiect: **ID\_ 1499**  
Nr. Proiect: **1105/2009**  
Director: **Prof. Dr. Radu SESTRAȘ – USAMV Cluj-Napoca**  
Perioada de derulare: **2009-2011**  
Site proiect:

## Raportare etapă (decembrie 2009)

### Importanța temei și stadiul actual al cercetărilor

Mărul ornamental (încadrat generic în literatura anglo-saxonă sub denumirea Crab Apples sau Flowering Crabapple – mere crabe, sau mărul de flori) își are originea în speciile sălbatice, rustice de măr. În engleza veche, termenul *crab* însemna mere pădurețe sau acre, astringente. În vestul Europei, pentru merele crab sunt reprezentative merele pădurețe ale speciei *Malus sylvestris*. Una dintre primele specii de *Malus* cunoscută ca “flowering crab” a fost *M. spectabilis* (Jackson, 2003). Un număr relativ mic de soiuri hibride, originare din specii rustice au devenit cunoscute ca surse excelente pentru obținerea jeleurilor de măr (conserve crab apple jelly), printre acestea situându-se John Downie în Anglia, Chestnut Crab în Minesotta, cultivat înainte de 1921, și Dolgo, în St. Petersburg, Rusia, cultivat înainte de 1917. Formele genitoare, ancestrale ale unor soiuri ornamentale-crabe larg cultivate, precum John Downie, Cheal’s Scarlet, Dartmouth, The Siberian nu sunt cunoscute.

Mărul ornamental cel mai cunoscut – mărul japonez, Japanese flowering crab apple (*M. floribunda*), originar din Japonia, cultivat înaintea anului 1862, are genitori încă necunoscuți (Fiala, 1994); se acceptă însă de majoritatea cercetătorilor că cel mai probabil este să aibă ca forme parentale speciile *M. sieboldii* (specie inclusă acum la *M. toringo*) x *M. baccata*. Cunoscut pentru mirosul extrem de puternic și distinct al florilor, abundența acestora, rezistența remarcabilă la boli și capacitatea de a da naștere unor descendenți hibridi valorosi, *M. floribunda* se situează printre cele mai cunoscute specii ornamentale. Ca un adevărat mar crab, *M. floribunda* are fructe mici (un cm în diametru), lung pedicelate, răspândite ușor de păsări, de culoare galben brună, fără valoare culinară (Jackson, 2003).

Din formele cu fructe mari ale diferitelor specii, doar *M. niedzwetzkyana* a contribuit cu adevărat la ameliorarea speciilor ornamentale. La sfârșitul secolului al XIX-lea, N. Hansen încrucișând plante obținute

din seminte ale *M. niedzwetzkyana* cu *M. baccata*, a obtinut mai multe soiuri ornamentale, incadrate in asa numita grupa Rosybloom (Fiiala, 1994). Soiurile de acest tip au fructe (needibile) cu o culoare izbitoare a pielitei si pulpei, purpurie, la fel ca cel mai important caracter ornamental: florile numeroase si mari, cu petale purpurii, cu un puternic impact decorativ. Atat in forma salbatica originala, cat si in cea moderna, reprezentata de numerosii hibridi, inclusiv genotipurile din grupa Rosybloom, *M. niedzwetzkyana* a fost si este mult utilizata in ameliorarea marului ornamental in SUA. Este posibil ca si soiurile ornamentale Wisley Crab si Harry Baker, originare din Anglia, sa aiba la origine tot specia *M. niedzwetzkyana*, insa acest lucru nu a fost confirmat, dar nici infirmat, pana in prezent de testele de marcare moleculara cu microsateliti sau alte tehnici de marcare moleculara si analiza ADN (Juniper si Mabblerley, 2006). Probabil ca *M. pumila niedzwetzkyana* a stat si la originea soiului Belfleur Krasnyi, cultivat in Murmansk, Rusia, din 1914, fapt clamat de catre Miciurin, care a considerat ca *M. niedzwetzkyana* este unul dintre parintii soiului respectiv (Fayers, 2002).

Chiar daca *M. niedzwetzkyana* este considerata de unii autori ca o specie distincta, Juniper si Mabblerley (2006) apreciaza ca este doar o forma mutanta de culoare rara a speciei *M. pumila*, la care frunzele, petiolul, lastarii si chiar lemnul tanar au o culoare rosie purpurie, o asemenea culoare, spectaculara, avand si florile. Fructele sunt de marime medie, conice si cu nervuri, cu pulpa rosie bordo, inchisa, succulenta, dar fara gust si valoare culinara. Deși are o larga raspandire ca forma ornamentala, ca specie și prin numerosii hibridi obtinuti, *M. niedzwetzkyana* se gaseste tot mai rar in flora spontana, pomi tineri pe radacini proprii inmultiti pe cale naturala fiind cautati si scosi din pamant de tarani sau ciobani si vanduti in pietele din Asia, in special China; de altfel, mai multe specii salbatice de mar din flora spontana sunt in pericol de extinctie (Juniper si Mabblerley, 2006).

Cu toate ca in cercetarea horticola din Romania si in special in ameliorarea marului s-au obtinut rezultate apreciabile, in ultimele doua decenii cercetarile in vederea obtinerii unor noi soiuri s-au diminuat, ele desfasurandu-se intr-un numar tot mai mic de unitati de cercetare si invatamant, la acelasi nivel de cunostinte ca in anii 80-90, utilizandu-se doar metodele clasice, conventionale de provocare si exploatare a variabilitatii naturale si artificiale. In plus, preocuparile in directia obtinerii unor soiuri de mar ornamental au fost practic nule in tara noastra (Sestras, 2007).

In schimb, in aceasta perioada, in alte tari, inclusiv in unele in care cercetarile in domeniu erau foarte limitate anterior, au inceput sa fie utilizate tot mai intens cele mai moderne metode de ameliorare, apelandu-se in acest scop la ingineria genetica si genetica moleculara, in cadrul cercetarilor avansate in acest sens si cu rezultate pe masura, concretizate in numeroase cultivaruri ornamentale.

Motivul principal pentru amploarea acestor cercetari stiintifice deosebite, la nivel mondial, nu se regaseste exclusiv in considerente economice, rezultate din avantajele introducerii in cultura a unor soiuri noi, productive, de calitate, rezistente genetic la boli, care sa nu necesite un numar mare de tratamente fitosanitare (cu toate consecintele negative care decurg de aici – consum de energie si costuri mari, degradarea solului, acumularea unor noxe din pesticide etc.). In momentul de fata consumatorii sunt mult mai exigenti fata de produsele pe care le cumpara, fructele ecologice fiind preferate. Astfel de fructe pot fi obtinute prin crearea si lansarea in cultura a unor soiuri rezistente genetic la atacul principalelor boli si daunatori, care nu necesita tratamente sau au nevoie de putine interventii fitosanitare.

De asemenea, primeaza pentru tot mai multi oameni aspectul si valoarea ornamentala a fiecărei plante cultivate, si contributia la ambient. In tarile din vestul Europei, in SUA si Asia soiurile ornamentale sunt extrem de cunoscute si valorificate din plin, nu numai in scopul infrumusetarii peisajului si imbunatatirii mediului de viata al oamenilor, in special in zonele urbane, ci si din alte considerente practice si, respectiv economice (Zion, 1994; Jackson, 2003).

În prezent, marul ornamental cunoaște o tot mai largă răspândire, odată cu creșterea nivelului de trai în țările civilizate, a dorinței de frumos a oamenilor și de îmbunătățire a calității mediului de viață (Zion, 1994). O tot mai mare amploare o au cultivările de mar ornamental, amplasate în parcuri, grădini sau pe marginile strazilor, decorând prin pomii cu creșteri și coroane diverse, columnare, globuloase sau pendule, frunzișul abundent și viu colorat (de la verde intens la roșietic), florile și fructele lor minunate colorate (Zion, 1994; Juniper și Mabberley, 2006). O adevărată modă o constituie în prezent și cultura la container, ghiveci sau de tip bonzai a soiurilor crabe, decorarea bordurilor, platbandelor, balcoanelor, spațiilor din diverse incinte cu pomi aparținând unor extrem de variate cultivări, prin prisma creșterii, coroanelor, culorii frunzelor, florilor, fructelor etc.

În procesul de ameliorare a mărului ornamental, vigoarea pomilor reprezintă o caracteristică importantă, fiind analizată în selecția descendenților seminali obținuți prin hibridări dirijate. Vigoarea pomilor a fost studiată în 25 de combinații hibride interspecifice, reprezentate de hibridi F1 proveniți din diferite specii ornamentale de *Malus*, utilizate ca genitori materni sau paterni, încrucișate cu diferite cultivări (soiuri) sau selecții. Vigoarea hibridilor a fost apreciată prin note, la progeni (hibridi F1) cu vârsta între patru și șapte ani, conform standardelor din ghidul UPOV: 3 – vigoare slabă; 5 – medie; 7 – mare. Media notelor pentru vigoarea descendenților F1 în cele 25 de combinații a oscilat între 4,00 și 6,13. Comparativ cu media experienței, considerată martor (5,20), cei mai viguroși hibridi s-au obținut în familiile ‘Cluj 218/2’ x *M. niedzwetzkyana* și ‘Reinette Baumann’ x *M. prunifolia*, în ambele cu diferențe semnificative de creștere față de media tuturor combinațiilor. Cea mai slabă vigoare s-a obținut la progenii proveniți din ‘Rosu de Cluj’ x *M. coronaria*, ‘Starkrimson’ x *M. prunifolia*, ‘Frumos de Voinesti’ x *M. floribunda*, ‘Cluj II-1-2’ x *M. floribunda*, *M. zumi* x ‘Reinette Baumann’, *M. coronaria* x ‘Reinette Baumann’. Nu au fost înregistrate diferențe semnificative pentru vigoarea hibridilor din grupul cu speciile de *Malus* utilizate ca genitori materni (5,18) și respectiv paterni (5,20). Coeficienții de variabilitate au oscilat în experiență între 2,6% și 27,4%; în zece familii variabilitatea caracterului a fost mică (sub 10%), în 13 medie (între 0-20%) și în două mare (peste 20%). Chiar dacă în unele combinații variabilitatea vigorii de creștere a pomilor nu a fost amplă, există posibilități de identificare prin selecție a unor hibridi cu vigoarea dorită în oricare familie hibridă.

Arborii se prezintă sub o mare diversitate de forme, mărimi, culori ale foliajului și a modului de înflorire. Întotdeauna se poate găsi arborele în ton cu spațiul și stilul amenajării, astfel încât să corespundă necesităților consumatorilor, și care să se adapteze la suprafața disponibilă, la climă, la tipul de teren, etc. Având o structură maestruoasă, arborii constituie structura parcurilor și a grădinilor, iar elementele de decor sunt completate ca și atuuri de numeroasele efecte benefice mediului (reduc poluarea, zgomotul, căldura, etc.) și psihicului oamenilor.

Prezența arborilor și arbuștilor fructiferi în amenajarea spațiilor verzi este bine justificată prin valoarea ornamentală, efectul original și de durată, interesul deosebit și diversitatea sporită a formelor și culorilor realizate. Prezintă frunze ovate sau eliptice, flori dese, de culoare rozie, fructe false de diferite mărimi, forme, culori și însușiri gustative sau tehnologice. Perioada de înflorire este deosebit de decorativă prin abundența florilor divers colorate, timp în care nota cromatică a unui spațiu este mult îmbunătățită. Ulterior, efectul decorativ este creat de fructe, într-o perioadă în care pentru unele specii elementele de decor spectaculoase lipsesc, sau sunt puse în evidență prin note contrastante. Pe lângă aceste elemente principale de decor, valoarea ornamentală a arborilor este dată și de port, coronament, foliaj, scoarta trunchiului, muguri.

Principalele forme în care poate fi condus marul sunt: piramidă, vas, cordon bilateral sau unilateral, palmetă, formă de „u”, cu trunchi mijlociu de înalt sau înalt. Formele cu ramificații dese (palmeta, cordonul, forma de „U”) sunt destinate formării de perdele, rânduri compacte și fructifică mai rapid decât alte forme de conducere. Atunci când se aleg pomi pentru aliniamentele stradale se va ține

cont de alegerea unor indivizi cu trunchi înalt, care să nu necesite intervenții numeroase pentru a nu optura vizibilitatea pietonilor sau conducătorilor auto.

Alte utilizări alese în funcție de necesitatea amenajării, proiectare și caracteristicile care se dorec evidențiate sunt:

- Individual: specii valoroase, deosebite, cu un puternic impact decorativ;
- Grupuri: plante ale aceleiași familii, fie omogene, fie în contrast, concretizându-se în punct de interes al amenajării;

a) Grupuri formale: alcătuite din specii care suportă tunsul pentru obținerea efectului decorativ propus, cu ramificații dese, compacte. pot fi conduse chiar ca și garduri, delimitând un spațiu intim, aparte de restul amenajării.

b) Grupuri libere: plante arbustive cu ramificare puternică și creștere neregulată;

- Plante cultivate în recipiente: destinate decorării unui spațiu limitat. Speciile care se pretează acestei prezentări au o creștere limitată și relativ lentă. Marul ornamental este tot mai des folosit și ca bonsai, fiind deosebit de apreciat sub această formă;

- Aliniamente, perdele de protecție pentru delimitarea spațială în amenajare, supuse unor pronunțate condiții de stres pentru plante;

- În completarea: bordurilor, rondourilor, peluzelor, artei topiare.

O importanță aparte o au speciile ornamentale de mar și în ameliorarea marului cultivat sau domestic, multe specii rustice sau hibridii lor cumulează resurse de gene de o valoare inestimabilă pentru crearea unor soiuri noi, valoroase, cu fructe de calitate, dar mai ales cu rezistență genetică la bolile care atacă marul: rapan (*Venturia inaequalis*), fainare (*Podosphaera leucotricha*), arsura bacteriană sau focul rozaceelor (*Erwinia amylovora*) s.a. Utilizarea speciei *M. floribunda* în ameliorarea marului și transferarea prin backcross a genei de rezistență la rapan Vf de la aceasta la soiuri cultivate precum Prima, Priscilla, Sir Prize, Priam, Florina s.a. este un exemplu bine cunoscut și prezentat în marile tratate de ameliorare (Gessler, 2001; Sansavini și colab., 2004; Sestras, 2004; Patrascu și colab., 2006). În mod similar, numeroase alte specii ornamentale sau hibridii lor au fost utilizați în ameliorarea rezistenței marului la rapan, fainare, arsura bacteriană sau alte boli, precum și a rezistenței la atacul insectelor dăunătoare.

De asemenea, unele specii rustice se folosesc ca portaltoi sau se utilizează în lucrările de ameliorare a portaltoilor, pentru inducerea rezistenței la ger, seceta, sau alți factori de stres, sau pentru inducerea vigoriei mici de creștere a combinației soi-portaltoi, conform cerințelor moderne ale pomiculturii intensive. Soiul ornamental de tip columnar Maypole, patentat ([www.freepatentsonline.com/PP06184.html](http://www.freepatentsonline.com/PP06184.html)), se poate utiliza ca genitor pentru transferarea la soiurile pentru fructe a genei Co, care determină creșterea compactă, columnară a pomilor, ideotip arhitectural care favorizează plantarea unui număr mare de pomi la unitatea de suprafață și intensivizarea culturilor (Sestras, 2004). Maypole are un foliaj dens și compact în jurul axului (frunzele tinere având o nuanță purpurie), fără ramificări laterale.

Un rol important îl pot avea soiurile ornamentale și ca polenizatori pentru soiurile comerciale, asigurând o foarte bună polenizare în livezi, datorită faptului că înfloresc abundent, concomitent cu soiurile cultivate pentru fructe; formează o cantitate mult mai mare de polen, iar polenul are o foarte bună capacitate de germinare (Kendall și Smith, 1975; Szklanowska și Dabska, 1991; Jackson, 2003; Dabska, 2005). Soiurile ornamentale de mar pot produce o cantitate dublă sau chiar mai mare de polen comparativ cu cele de desert (Jackson, 2003). În unele livezi comerciale din SUA, tot al șaselea sau al șaptelea rând este ocupat de soiuri crab, care datorită abundenței și coloritului florilor atrag albinele, favorizându-se o bună polenizare, legare a florilor și producție de fructe. Printre genotipurile remarcate ca bune polenizatoare se situează John Downie, Malus Hillieri, Golden Hornet, WinterGold.

La multe mere crabe, din fructele acrisoare de culoare purpurie se poate prepara un jeleu de foarte buna calitate, cu o culoare deosebit de atragatoare si o aroma fina, fragrantă, specifică, naturală.

Lemnul provenit de la pomii imbatraniti sau defrisati se poate intrebuinta in diferite moduri, cu utilizare practica in industrie sau activitati casnice.

Chiar daca in prezent sunt utilizate in amenajarea si infrumusetarea peisajului peste 35 de specii si 700 cultivaruri de tip crab, iar dupa unii autori exista chiar peste 800 de soiuri de mar ornamental (Shaughnessy si Polomski, 2006), crearea unor noi astfel de cultivaruri este pe deplin justificata, iar datele si informatiile stiintifice prezentate sunt argumente consistente in acest sens.

Oricand in viitor asemenea genotipuri pot fi deosebit de utile si in ameliorarea marului pentru consum, la care datorita eroziunii genetice si presiunii de selectie exercitata in timp si numarului relativ mic de soiuri cultivate pe scara larga si a originii comune a multora dintre ele, baza genetica s-a ingustat foarte mult (Sestras, 2004; comunicari personale: Hough, Cociu, Le Lezec, Bucarciuc). Faptul poate constitui un potential pericol, intrucat si marul, la fel ca alte specii importante de cultura, poate deveni vulnerabil la aparitia unor noi factori de risc, a unor noi rase fiziologice sau surse de virulenta, la care majoritatea soiurilor consacrate sa fie sensibile. Prin urmare, tinandu-se cont de fenomenul de erodare genetica ce apare in cadrul speciei cultivate, trebuie actionat in directia diversificarii urgente a surselor de rezistenta in programele de creare de noi soiuri (Lespinasse, 1992; Parisi si colab., 1993; 2004; Fischer si colab., 1994, 2001; 2006; Schmidt, 1994; Kruger, 1994, 1995; 2005; Kellerhals, M., 1989, 2004 etc.). In acest sens, o cale luata tot mai mult in considerare de amelioratori pentru contracararea unor asemenea riscuri, dar si pentru amplificarea si sporirea diversitatii genetice necesara crearii de soiuri noi, o constituie utilizarea unor specii rustice, ornamentale, si a hibrizilor acestora.

Combinarea selectiei clasice prin care au fost obtinute cele mai multe soiuri de mar, in esenta reprezentata de selectia clonala (ca o varianta a selectiei individuale simple, in care planta elita este aleasa din campurile de hibrizi, plante mutante etc.) si inmultita vegetativ, prin altoire, cu selectia recurenta si alegerea familiilor hibride pe baza valorilor CGC (capacitatii generale de combinare) ale formelor parentale, poate asigura o eficienta sporita a procesului de ameliorare la mar (Oraguzie si colab., 2001, 2003, 2004). O asemenea metoda ar putea determina si reducerea substantiala a marimii populatiilor hibride necesare selectiei, aspect mentionat si de Noiton si Shelbourne (1992) care au aplicat selectia recurenta pentru CGC in vederea imbunatatirii genetice a unei populatii hibride ameliorate la mar.

Mai mult chiar, Juniper si Mabberley (2006) considera ca numeroasele ipoteze sau speculatii privind originea unor soiuri ornamentale trebuie verificate cu ajutorul metodelor moderne de marcare moleculara si analiza la nivel de ADN, cu ajutorul carora se poate stabili riguros si gradul de inrudire al diferitelor cultivaruri.

Marul ornamental este cultivat in primul rand pentru flori si fructe, dar in zestrea ereditara a speciilor de *Malus* exista numeroase elemente cu valoare decorativa (tabelul 1).

Inflorirea poate avea loc inainte, sau deodata cu infrunzirea, in diferite momente ale primaverii, in nuante de la alb, la roz, sau rosu. Ca si la marul de consum, inflorirea abundenta poate avea in unele cazuri alternanta de 2 ani.

Cultivarurile ornamentale se disting si prin port si habitus, avand cel mai adesea un coronament mai spectaculos decat soiurile cultivate.

Fiind recent create si introduse in conveerul varietal al genului, cele mai multe soiuri si cultivaruri de mar ornamental au rezistenta, sau toleranta genetica la principalele boli ale marului.

În afara utilizării speciilor de *Malus* ca forme ornamentale, numeroase caracteristici pot fi transferate de la diferite specii sălbatice (rustice) de *Malus* la formele cultivate, printre care: rezistența la ger (de la *M. baccata* și *M. prunifolia*), rezistența la rapăn (*M. floribunda*, *M. atrosanguinea*), rezistența la făinare (*M. zumi*) etc.

Tabelul 1

Tipicul înflorii și fructificării la principalele specii de *Malus*\*

Specia	Inflorire	Fructificare	Culoarea fructelor la maturitate	Inaltimea pomilor la maturitate (m)	Cultivat din anul
<i>M. baccata</i>	Mai	Aug - Oct	Roșu sau galben	12.2	1784
<i>M. coronaria</i>	Martie- Mai	Sept - Nov	Galben, verde	9.2	1724
<i>M. floribunda</i>	Mai	-	Roșu sau galben	3.6-10.0	1862
<i>M. fusca</i>	-	Oct - Nov	Galben, verde, roșu	8-12.2	1836
<i>M. ioensis</i>	Mai- Iunie	Sept - Oct	Verde, cu pruină	-	1885
<i>M. pumila</i>	Mai	Aug - Oct	Galben, roșu	15.4	-
<i>M. robusta</i>	Apr- Mai	-	Roșu, galben, verde	15.4	1815
<i>M. sargentii</i>	-	-	Roșu	1.8- 2.5	-

\*Sursa: Callahan (1996), Crossley (1974), Fiala (1994), Krussmann (1960), Nielsen (1988), Rehder (1940), Sudworth (1098), Van Dersal (1938).

### Material și metodă de lucru

Materialul biologic utilizat în experiență a fost reprezentat de hibrizi interspecifici de măr, amplasați în câmpurile experimentale ale Stațiunii de Cercetare Dezvoltare pentru Pomicultură Cluj-Napoca. Hibridii respectivi au provenit din încrucișări interspecifice, având în ascendență, ca genitori, specii rustice precum: *Malus coronaria*, *M. Floribunda*, *M. Niedzwetzkyana*, *M. Zumi*, *M. Prunifolia*.

În generația F<sub>1</sub>, au fost analizați 2190 hibrizi, cu un număr variabil în interiorul combinațiilor hibride, oscilând între 17 și 248 descendenți/combinatie (Figura 1, Figura 2).

În analiza hibridilor interspecifici F<sub>1</sub>, s-au avut în vedere cele mai importante caracteristici ale pomilor, efectuându-se numeroase investigații privind particularitățile speciilor și soiurilor utilizate ca genitori, observații, măsurători, determinări și prelucrări statistice ale datelor experimentale.

În câmpurile de hibrizi nu s-au efectuat intervenții asupra pomilor (tăieri, conducere dirijată etc.) și nici tratamente fitosanitare. S-a urmărit creșterea plantelor și formarea coroanei, în mod natural, iar comportarea la atacul bolilor și dăunătorilor în condiții naturale de infecție și infestare, prin excluderea tratamentelor de prevenire sau combatere.

Prelucrarea datelor experimentale s-a efectuat prin analiza varianței, testul diferențelor limită (DL) și/sau testul „t”, datele obținute fiind prezentate în tabele de sinteză. Metodele de calcul utilizate în analiza varianței au respectat instrucțiunile din literatura de specialitate (Ardelean și Sestraș, 1996). Variabilitatea caracteristicilor analizate în experiență a fost apreciată pe baza coeficienților de variabilitate, calculați după formula:  $s \% = s / x \cdot 100$  (Ceapoiu, 1968; Botez și colab., 1995). Corelațiile dintre caracteristicile studiate au fost estimate statistic, prin calculul coeficienților de corelație și stabilirea semnificației acestora, comparându-se valorile calculate cu cele teoretice, pentru probabilitățile de transgresiune de 5%, 1% și 0,1%, respectându-se recomandările din literatura de specialitate (Săulescu, 1967; Ceapoiu, 1968; Botez și colab., 1995; Ardelean și Sestraș, 1996).

În generația F<sub>1</sub>, au fost analizați 2190 hibrizi, cu număr variabil în interiorul combinațiilor hibride, oscilând între 17 și 248 descendenți/combinatie.

### **Hibridări dirijate, interspecifice**

Ardelean x *M. niedzwetzkyana*  
Aromat de vara x *M. coronaria*  
Cluj 218/2 x *M. coronaria*  
Cluj 218/2 x *M. floribunda*  
Cluj 218/2 x *M. niedzwetzkyana*  
Cluj 218/2 x *M. zumi*  
Cluj II-1-2 x *M. floribunda*  
Cluj II-1-2 x *M. M. niedzwetzkyana*  
Frumos de Voinești x *M. floribunda*  
Frumos de Voinești x *M. niedzwetzkyana*  
Frumos de Voinești x *M. zumi*  
Golden Delicious x *M. prunifolia*  
*M. coronaria* x Jonathan  
*M. coronaria* x Reinette Baumann  
*M. floribunda* x Reinette Baumann  
*M. prunifolia* x Roșu de Cluj  
*M. zumi* x Golden Delicious  
*M. zumi* x Jonathan  
*M. zumi* x Reinette Baumann  
Reinette Baumann x *M. niedzwetzkyana*  
Reinette Baumann x *M. prunifolia*  
Reinette Baumann x *Malus floribunda*  
Roșu de Cluj x *M. coronaria*  
Roșu de Cluj x *M. niedzwetzkyana*  
Roșu de Cluj x *M. prunifolia*

Generația F<sub>2</sub> a fost reprezentată de descendenții elitelor selecționate în câmpurile de hibrizi F<sub>1</sub>, în număr de 53 elite, care au dat două tipuri de descendenți seminali: obținuți prin polenizare liberă (în câmpul de hibrizi, intercross, polenizare panmictică) și obținuți prin polenizare dirijată. În funcție de acest material biologic, a fost elaborat modelul funcțional pentru aplicarea selecției recurente și MAS (Marker Assisted Selection). Numărul hibrizilor analizați în câmpul de descendenți F<sub>2</sub> a fost de 1400.

În analiza hibrizilor interspecifici F<sub>1</sub> și F<sub>2</sub>, s-au avut în vedere cele mai importante caracteristici ale pomilor, efectuându-se investigații privind particularitățile descendenților seminali, comparativ cu speciile și soiurile utilizate ca genitori.

În câmpurile de hibrizi nu s-au efectuat intervenții asupra pomilor (tăieri, conducere dirijată etc.) și nici tratamente fitosanitare.

S-a urmărit creșterea plantelor și formarea coroanei, în mod natural, iar comportarea la atacul bolilor în condiții naturale de infecție. Prelucrarea datelor experimentale s-a efectuat prin analiza varianței (ANOVA), datele obținute fiind prezentate în tabele de sinteză.

**P: Hibridări dirijate, interspecifice**

Ardelean x *M. niedzwetzkyana*  
Aromat de vara x *M. coronaria*  
Cluj 218/2 x *M. coronaria*  
Cluj 218/2 x *M. floribunda*  
Cluj 218/2 x *M. niedzwetzkyana*  
Cluj 218/2 x *M. zumi*  
Cluj II-1-2 x *M. floribunda*  
Cluj II-1-2 x *M. M. niedzwetzkyana*  
Frumos de Voinești x *M. floribunda*  
Frumos de Voinești x *M. niedzwetzkyana*  
Frumos de Voinești x *M. zumi*  
Golden Delicious x *M. prunifolia*  
*M. coronaria* x Jonathan  
*M. coronaria* x Reinette Baumann  
*M. floribunda* x Reinette Baumann  
*M. prunifolia* x Roșu de Cluj  
*M. zumi* x Golden Delicious  
*M. zumi* x Jonathan  
*M. zumi* x Reinette Baumann  
Reinette Baumann x *M. niedzwetzkyana*  
Reinette Baumann x *M. prunifolia*  
Reinette Baumann x *Malus floribunda*  
Roșu de Cluj x *M. coronaria*  
Roșu de Cluj x *M. niedzwetzkyana*  
Roșu de Cluj x *M. prunifolia*  
etc.

↓

**F<sub>1</sub>: Hibrizi interspecifici = 2190**

(25 combinații, între 17 și 248 descendenți/combinăție)

↓

Selecție

↓

Elite selecționate = 53

(Intensitatea selecției = 2,42%)

↓

Polenizare liberă (29 elite) și polenizare dirijată cu soiuri (15 elite) în câmpul F<sub>1</sub>;  
Recoltare fructe, extragere semințe hibride, semănat, plantat → hibrizi F<sub>2</sub>

↓

**F<sub>2</sub>: Hibrizi interspecifici = 1400**

(44 combinații, între 7 și 139 descendenți/combinăție)

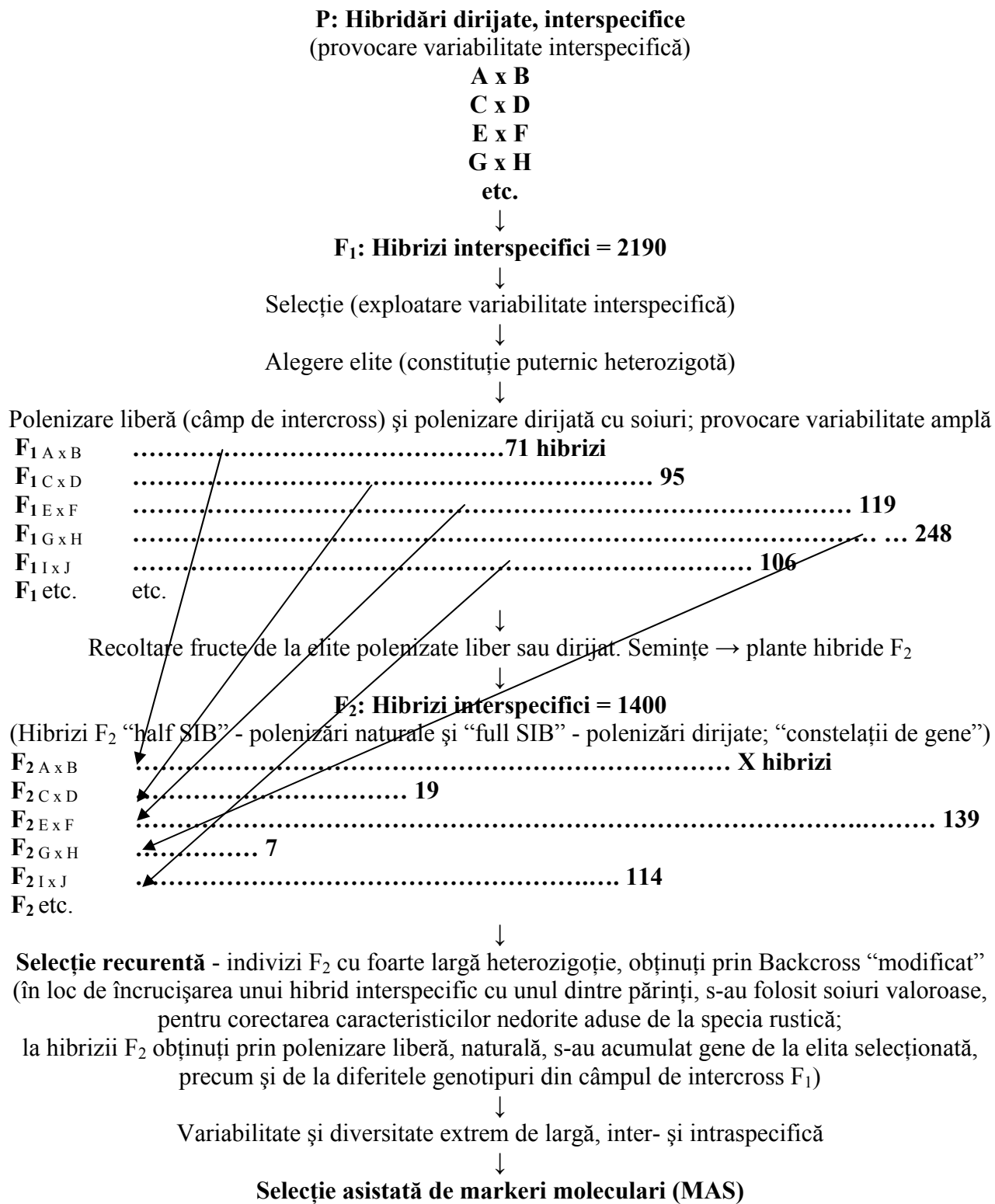
↓

Selecție (fenotipică, genotipică, MAS)

↓

?

**Figura 1. Materialul biologic și originea hibrizilor interspecifici F<sub>1</sub> și F<sub>2</sub> de măr**



**Figura 2. Elaborare model funcțional pentru aplicarea selecției recurente și MAS**

## Rezultate și discuții

### Vigoarea de creștere a pomilor

În aprecierea vigoriei de creștere a pomilor la genitorii utilizați în hibridări s-au utilizat normele UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Guidelines, for Ornamental Apple - *Malus* Mill., 2003). Prin aplicarea scalei UPOV (3 – vigoare slabă; 5 – medie; 7 – puternică), s-au obținut rezultatele din tabelul 2.

Tabelul 2

Vigoarea speciilor și soiurilor utilizate ca genitori în hibridările interpecifice, apreciată în conformitate cu normele UPOV

Genotipul parental	Genitor (♀-matern; ♂-patern)	Vigoarea, apreciată prin:	
		Fenotip	Note UPOV
<i>M. coronaria</i>	♀; ♂	Slabă	3
<i>M. floribunda</i>	♀; ♂	Medie	5
<i>M. prunifolia</i>	♀; ♂	Medie spre mare	7
<i>M. zumi</i>	♀; ♂	Medie	3
<i>M. niedzwetzkyana</i>	♂; ♂	Medie	3
‘Reinette Baumann’	♀; ♂	Mare	7
‘Roșu de Cluj’	♀; ♂	Foarte mică	3
‘Golden Delicious’	♀; ♂	Medie spre mare	5
‘Jonathan’	♂	Medie	5
‘Ardelean’	♀	Medie	5
‘Cluj 218/2’	♀	Mare	7
‘Cluj II-1-2’	♀	Mare	7
‘Frumos de Voinești’	♀	Mare	7
‘Starkrimson’	♀	Foarte mică, spur	3

În cadrul celor 25 combinații de măr studiate, vigoarea de creștere a pomilor la hibridii F<sub>1</sub> a fost apreciată în funcție de înălțimea pomilor, măsurată de la nivelul solului până la vârful pomilor. Datele au fost prelucrate statistic, ca valori medii ale caracterului (exprimate în m), pentru fiecare combinație studiată.

Rezultatele obținute pentru înălțimea medie a pomilor, exprimată în m la combinațiile de măr studiate în experiență, sunt redată în tabelul 3.

Media notelor pentru vigoarea hibridilor F<sub>1</sub> în cele 25 combinații a fost cuprinsă între 4,00 și 6,13 m. În urma prelucrării statistice a datelor privind vigoarea pomilor, hibridii din combinația Cluj 218/2 x *M. niedzwetzkyana* au prezentat vigoarea cea mai mare, cu diferențe foarte semnificativ superioare, în comparație cu valoarea medie a caracterului pe experiență (5.20 m), considerată variantă martor. O vigoare mare a pomilor s-a înregistrat și la combinația Reinette Baumann x *M. prunifolia*, înregistrată cu diferențe distinct semnificative (5.92 m).

Tabelul 3

Vigoarea de creștere a pomilor, apreciată în funcție de înălțimea pomilor (m),  
la combinațiile de măr\*

Nr. crt.	Combinația hibridă	Înălțimea pomilor (m)	Diferența (m)	Valoarea t	Semnif.	Coef. Variab. (s%)
1	<i>M. coronaria</i> x 'Jonathan'	4.93	-0.27	-0.48	-	27.4
2	<i>M. coronaria</i> x 'Reinette Baumann'	4.88	-0.32	-2.24	ooo	5.1
3	<i>M. floribunda</i> x 'Reinette Baumann'	5.47	0.27	1.10	-	7.4
4	<i>M. prunifolia</i> x 'Rosu de Cluj'	5.35	0.15	0.42	-	9.3
5	<i>M. zumi</i> x 'Golden Delicious'	5.60	0.40	0.92	-	17.2
6	<i>M. zumi</i> x 'Jonathan'	5.13	-0.07	-0.46	-	11.1
7	<i>M. zumi</i> x 'Reinette Baumann'	4.93	-0.27	-2.68	ooo	4.5
8	'Ardelean' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	5.52	0.32	1.42	-	11.8
9	'Cluj 218/2' x <i>M. floribunda</i>	5.18	-0.02	-0.13	-	6.8
10	'Cluj 218/2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	6.13	0.93	7.04	xxx	4.8
11	'Cluj 218/2' x <i>M. zumi</i>	5.40	0.20	1.06	-	10.3
12	'Cluj II-1-2' x <i>M. floribunda</i>	4.77	-0.43	-1.77	o	8.5
13	'Cluj II-1-2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	5.01	-0.19	-0.80	-	17.0
14	'Frumos de Voinești' x <i>M. floribunda</i>	4.73	-0.47	-1.95	oo	15.3
15	'Frumos de Voinești' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	5.37	0.17	0.95	-	10.4
16	'Frumos de Voinești' x <i>M. zumi</i>	5.18	-0.02	-0.13	-	6.8
17	'Golden Delicious' x <i>M. prunifolia</i>	5.08	-0.12	-0.54	-	13.8
18	'Reinette Baumann' x <i>M. floribunda</i>	5.37	0.17	0.69	-	11.8
19	'Reinette Baumann' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	5.50	0.30	0.70	-	15.4
20	'Reinette Baumann' x <i>M. prunifolia</i>	5.92	0.72	4.09	xx	8.2
21	'Reinette Baumann' x <i>Malus zumi</i>	5.33	0.13	0.35	-	24.4
22	'Rosu de Cluj' x <i>M. coronaria</i>	4.00	-1.20	-5.54	ooo	10.2
23	'Rosu de Cluj' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	5.38	0.18	0.97	-	12.9
24	'Rosu de Cluj' x <i>M. prunifolia</i>	5.39	0.19	0.97	-	13.5
25	'Starkrimson' x <i>M. prunifolia</i>	4.43	-0.77	-7.80	ooo	2.6
	Mean of experiment (Control)	5.20	-	-	-	11.5

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Pozitive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

Cea mai mică vigoare s-a înregistrat la descendenții proveniți din încrucișările 'Rosu de Cluj' x *M. coronaria*, 'Starkrimson' x *M. prunifolia*, 'Frumos de Voinești' x *M. floribunda*, 'Cluj II-1-2' x *M. floribunda*, *M. zumi* x 'Reinette Baumann', *M. coronaria* x 'Reinette Baumann'.

Variabilitatea înălțimii pomilor a fost mică la zece combinații, sub 10%. O variabilitate medie a caracterului a fost înregistrată la 11 combinații, la care s% a avut valori peste 10%, iar două combinații au înregistrat o variabilitate a caracterului apreciată drept mare, peste 20%. Valoarea medie coeficientului de variabilitate s% pe experiență a fost de 11,5%, iar limitele de variație s% pentru

vigoarea de creștere a pomilor au oscilat între 2,6% (*Starkrimson* x *M. prunifolia*) și 27,4% (*M. coronaria* x *Jonathan*).

Datele obținute confirmă ipotezele din literatura de specialitate, conform cărora vigoarea pomilor la măr este sub control poligenic, fapt ilustrat și de expresia s% a caracterului la hibridii rezultați din încrucișarea genotipurilor parentale. În general, transmiterea vigoriei în descendență a fost în conformitate cu expresia acesteia la genitori, respectiv media descendenților a fost în concordanță cu cea a ascendenților.

Unele excepții sau abateri ar putea fi datorate triploidiei unor genitori (ex. 'Reinette Baumann') care sunt viguroși, dar a căror descendenți pot manifesta o vigoare redusă datorită aneuploidiei, precum și efectelor de dominanță sau epistazie care participă la ereditatea vigoriei pomilor pe lângă cele de aditivitate.

Prin gruparea combinațiilor hibride după genitorul rustic utilizat ca formă maternală sau paternală, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între media notelor pentru vigoare la descendenții care au avut specii de *Malus* ca mamă (5,18) sau tată (5,20). Fiecare specie rustică și-a transmis cu fidelitate vigoarea de creștere în descendență, atât ca genitor matern cât și patern, diferențe evidente obținându-se numai în cazul speciei *M. coronaria* (Fig. 3).

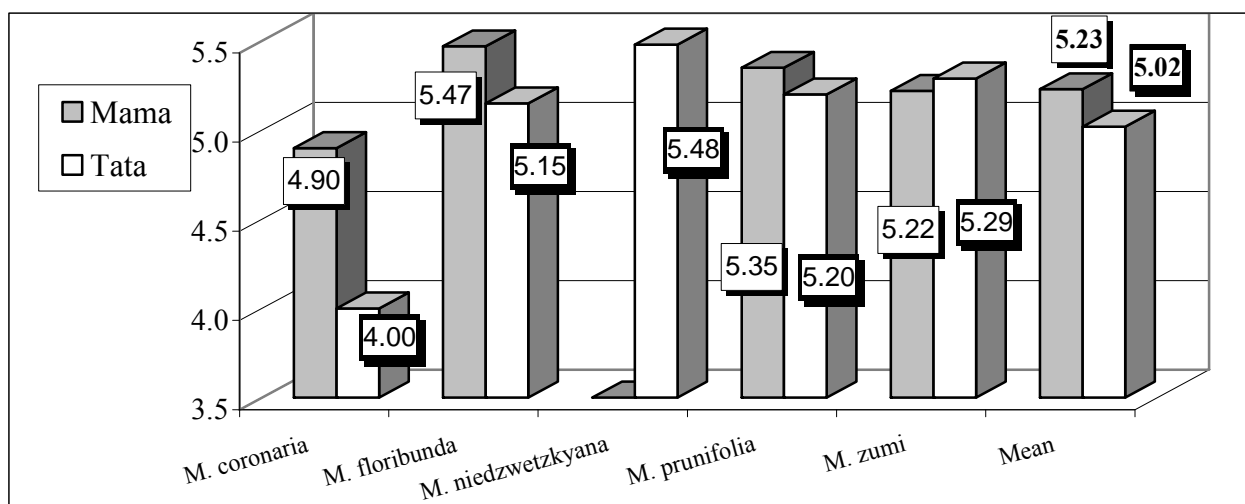


Fig. 3. Media notelor pentru vigoarea de creștere a pomilor la hibridii F<sub>1</sub> interspecifici, în funcție de utilizarea speciilor de *Malus* ca genitori materni sau paterni

Pe lângă informațiile obținute privind determinismul genetic al vigoriei de creștere a pomilor în hibridările îndepărtate, interspecifice, rezultatele ilustrează și faptul că, practic, în oricare combinație hibridă există posibilități de identificare prin selecție a unor descendenți hibridi cu vigoarea dorită, chiar dacă variabilitatea caracterului nu a fost deosebit de largă în interiorul fiecărei familii interspecifice.

## Rezultatele obținute privind anul primei fructificari

**Durata perioadei juvenile** a pomilor este foarte importantă la măr, atât în cazul soiurilor, cât și în cazul hibridilor aflați în procesul de selecție. La soiuri, cu cât intrarea pomilor pe rod este mai timpurie, cu atât există premise pentru amortizarea mai rapidă a cheltuielilor necesitate de înființarea plantațiilor (Sestras, 2004).

Tabelul 4

Durata perioadei juvenile, apreciată în funcție de anul primei fructificări (valori medii - ani), a hibridilor interspecifici F<sub>1</sub> din combinațiile din experiență\*

Nr. crt.	Combinația hibridă	Anul primei fructificări	Diferența (±ani)	Valoarea t	Semnif.	Coef. Variab. (s%)
1	<i>M. coronaria</i> x 'Jonathan'	7.1	-0.2	-0.8	-	4.7
2	<i>M. coronaria</i> x 'Reinette Baumann'	9.3	2.3	3.5	xxx	13.6
3	<i>M. floribunda</i> x 'Reinette Baumann'	7.3	0.3	0.8	-	13.1
4	<i>M. prunifolia</i> x 'Rosu de Cluj'	7.0	0.0	0.1	-	6.7
5	<i>M. zumi</i> x 'Golden Delicious'	8.3	1.4	1.5	-	18.3
6	<i>M. zumi</i> x 'Jonathan'	7.5	0.5	2.0	x	11.4
7	<i>M. zumi</i> x 'Reinette Baumann'	7.8	0.8	2.0	x	15.8
8	'Ardelean' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.2	0.2	1.1	-	5.6
9	'Cluj 218/2' x <i>M. floribunda</i>	7.3	0.3	1.0	-	6.9
10	'Cluj 218/2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.0	0.0	0.1	-	13.6
11	'Cluj 218/2' x <i>M. zumi</i>	7.3	0.4	1.0	-	11.1
12	'Cluj II-1-2' x <i>M. floribunda</i>	7.0	0.0	0.1	-	11.7
13	'Cluj II-1-2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.3	0.4	1.0	-	7.9
14	'Frumos de Voinești' x <i>M. floribunda</i>	7.5	0.5	1.0	-	9.4
15	'Frumos de Voinești' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.6	0.6	2.2	x	7.2
16	'Frumos de Voinești' x <i>M. zumi</i>	6.0	-1.0	-2.3	o	27.2
17	'Golden Delicious' x <i>M. prunifolia</i>	6.6	-0.4	-0.6	-	27.8
18	'Reinette Baumann' x <i>M. floribunda</i>	7.6	0.6	2.4	x	7.1
19	'Reinette Baumann' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.3	0.3	1.0	-	6.9
20	'Reinette Baumann' x <i>M. prunifolia</i>	6.8	-0.2	-0.4	-	21.9
21	'Reinette Baumann' x <i>Malus zumi</i>	8.1	1.1	4.1	xxx	9.8
22	'Rosu de Cluj' x <i>M. coronaria</i>	7.3	0.3	0.6	-	13.2
23	'Rosu de Cluj' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	7.0	0.0	0.1	-	9.0
24	'Rosu de Cluj' x <i>M. prunifolia</i>	6.1	-0.8	-1.7	-	31.5
25	'Starkrimson' x <i>M. prunifolia</i>	7.3	0.4	1.0	-	7.9
Media experienței (Mt.)		7.3	-	-	-	12.8

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Positive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

În ameliorarea mărului, perioada juvenilă determină numărul de ani în care hibridii ocupă spațiu și necesită întreținere înainte de a li se putea stabili valoarea reală (producția, calitatea fructelor), de aceea, cu cât durata juvenilă este mai lungă, cu atât cheltuielile sunt mai mari. Creșterea și dezvoltarea hibridilor de măr obținuți din sămânță este lentă, durata perioadei juvenile fiind destul de lungă, variind între 3 și 10 ani, și fiind puternic influențată de genotipul plantelor, dar și de practicile culturale aplicate (Janick și colab., 1996).

Rezultatele obținute privind anul primei fructificări a hibridilor interspecifici  $F_1$ , exprimată în ani, ca valori medii pe fiecare combinație hibridă de măr din experiență, sunt redată în tabelul 4.

Anul primei fructificări a avut valori diferite în cadrul combinațiilor studiate, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între 6.0 și 9.3 ani. Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor șase combinații a avut valoarea de 7.3 ani.

În urma prelucrării statistice a datelor privind anul primei fructificări, valori asigurate din punct de vedere statistic, comparativ cu media experienței, s-au înregistrat la patru combinații. Dintre acestea, doar una a prezentat diferențe inferioare, în timp ce trei au avut diferențe superioare, semnificând o intrare tardivă pe rod a hibridilor: Cluj II-1-2 x *M. Floribunda*, Reinette Baumann x *Malus zumi*, Cluj 218/2 x *M. floribunda*.

Singura combinație care s-a remarcat prin hibridi cu intrare timpurie pe rod, cu diferențe asigurate statistic, a fost *M. zumi* x Jonathan. Chiar și la această încrucișare, durata medie până la prima fructificare a descendenților  $F_1$  a fost destul de lungă, de șase ani.

O perioadă juvenilă lungă s-a înregistrat la hibridii din combinațiile Cluj II-1-2 x *M. Floribunda* (9,3 ani), Reinette Baumann x *Malus zumi* (8,1 ani), Cluj 218/2 x *M. Floribunda* (9,3 ani) cu diferențe superioare, asigurate statistic.

În interiorul variantelor, variabilitatea intrării pe rod a fost mică la 12 combinații hibride (s% sub 10%). O variabilitate medie a fost înregistrată la nouă combinații (s% între 10-20%), iar la patru combinații variabilitatea caracterului a fost mare (>20%).

Este interesant de remarcat faptul că la hibridii proveniți din încrucișările care au determinat cea mai scurtă perioadă juvenilă, *M. zumi* x Jonathan și *M. zumi* x Reinette Baumann, s-a înregistrat cea mai amplă variabilitate a intrării pe rod (27.2% și 27.8%). Rezultatele confirmă datele din literatura de specialitate, conform cărora unele specii rustice, precum *M. zumi*, transmit descendenților seminali o perioadă juvenilă mai scurtă decât cea transmisă de soiuri (Zimmerman, 1972; Schmidt, 1985).

Lungimea perioadei juvenile a hibridilor este importantă și datorită faptului că este corelată direct cu precocitatea intrării pe rod după înmulțirea prin altoire, astfel că, în procesul de selecție, sunt preferați hibridii cu o intrare cât mai timpurie pe rod. De aceea, hibridii care nu intră pe rod până în anul șase de la obținerea din semințe sunt considerați fără perspective și se pot elimina (Cociu și Oprea, 1989).

Aplicarea unui asemenea criteriu de alegere este discutabilă, întrucât, în multe combinații hibride, descendenții seminali intră pe rod târziu, abia după 8-9 ani de viață (Ardelean și colab., 1992; Sestraș și colab., 1992). De exemplu, dintre 1.230 de hibridi proveniți din genitori diferiți, în anul șase de viață au intrat pe rod doar 17,4%, iar în anul opt 57,6% (Sestraș, 1997). Rezultă că aplicarea selecției pe baza considerentului anterior ar determina înlăturarea unei cantități impresionante de material biologic, de aceea este de preferat ca hibridii să fie menținuți în câmp cel puțin până în momentul în care majoritatea intră pe rod, cu toate inconvenientele ce decurg de aici (creșterea duratei, și așa îndelungată, în care plantele ocupă teren, necesită întreținere, ca atare cheltuieli bănești și de forță de muncă etc.).

## Rezultatele obținute privind mărimea fructelor

Mărimea fructului constituie, la măr, un element de productivitate extrem de important, care, în afară de influențele ereditare, este puternic condiționat de factorii de mediu și de cultură.

Tabelul 5

Mărimea fructelor, apreciată în funcție de notele medii, la combinațiile de măr\*

Nr. crt.	Combinația hibridă	Mărimea fructelor	Diferența	Valoarea "t"	Semnif.	Coef. Variab. (s%)
1	<i>M. coronaria</i> x 'Jonathan'	3.0	0.4	1.0	-	33.3
2	<i>M. coronaria</i> x 'Reinette Baumann'	2.5	-0.1	-0.3	-	40.0
3	<i>M. floribunda</i> x 'Reinette Baumann'	2.7	0.1	0.2	-	27.9
4	<i>M. prunifolia</i> x 'Rosu de Cluj'	3.2	0.6	1.2	-	46.1
5	<i>M. zumi</i> x 'Golden Delicious'	2.3	-0.3	-0.5	-	49.5
6	<i>M. zumi</i> x 'Jonathan'	3.1	0.5	1.4	-	39.2
7	<i>M. zumi</i> x 'Reinette Baumann'	3.2	0.6	1.5	-	35.5
8	'Ardelean' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	3.0	0.4	1.2	-	29.8
9	'Cluj 218/2' x <i>M. floribunda</i>	2.5	-0.1	-0.3	-	40.0
10	'Cluj 218/2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	2.3	-0.3	-1.0	-	42.2
11	'Cluj 218/2' x <i>M. zumi</i>	3.0	0.4	0.7	-	42.2
12	'Cluj II-1-2' x <i>M. floribunda</i>	2.8	0.1	0.4	-	18.2
13	'Cluj II-1-2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	2.3	-0.3	-0.5	-	49.5
14	'Frumos de Voinesti' x <i>M. floribunda</i>	2.0	-0.6	-0.6	-	70.7
15	'Frumos de Voinesti' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	3.0	0.4	0.6	-	47.1
16	'Frumos de Voinesti' x <i>M. zumi</i>	2.4	-0.3	-1.0	-	40.3
17	'Golden Delicious' x <i>M. prunifolia</i>	3.2	0.6	1.5	-	35.5
18	'Reinette Baumann' x <i>M. floribunda</i>	2.4	-0.2	-0.6	-	40.2
19	'Reinette Baumann' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	2.5	-0.1	-0.3	-	40.0
20	'Reinette Baumann' x <i>M. prunifolia</i>	2.8	0.1	0.5	-	24.0
21	'Reinette Baumann' x <i>Malus zumi</i>	1.5	-1.1	-4.0	ooo	60.3
22	'Rosu de Cluj' x <i>M. coronaria</i>	3.0	0.4	0.4	-	54.4
23	'Rosu de Cluj' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	3.1	0.5	1.6	-	36.7
24	'Rosu de Cluj' x <i>M. prunifolia</i>	3.0	0.4	1.1	-	42.2
25	'Starkrimson' x <i>M. prunifolia</i>	4.0	1.4	2.3	x	25.0
Media experienței (Mt.)		2.8	-	-	-	40.4

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Positive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

\*Legenda: aprecierea mărimii fructelor s-a efectuat prin bonitare, utilizându-se următoarea scară de notare (conform normelor UPOV):

1 = fructe foarte mici;

- 3 = fructe mici;
- 5 = fructe medii;
- 7 = fructe mari;
- 9 = fructe foarte mari.

În descendențele încrucișărilor interspecifice se transmit, pe lângă caractere dezirabile ale părintelui sălbatic, și cele nefavorabile, îndeosebi mărimea foarte mică și gustul slab al fructelor. Întrucât hibridii interspecifici moștenesc în mod preponderent astfel de caractere, ei trebuie utilizați în încrucișări și retroîncrucișări cu soiuri valoroase, pentru corectarea caracteristicilor nedorite aduse de la specia rustică.

Într-o lungă perioadă de timp, pornindu-se de la specia *M. floribunda*, cu fructe mici, având aproximativ 1 cm în diametru, s-a ajuns la noile soiuri rezistente la rapăn (Prima, Priscilla, Priam, Florina etc.), a căror fructe au un diametru de peste 70-75 mm.

La noi în țară, prin hibridare interspecifică urmată de selecție și hibridări succesive, s-a obținut soiul Generos, cu rezistență poligenică la rapăn moștenită de la *M. kaido* (Șerboiu, 1990).

Rezultatele obținute privind mărimea fructelor, exprimată în valori medii la combinațiile de măr studiate în experiență, sunt redate în tabelul 5.

Greutatea fructelor a avut valori diferite în cadrul combinațiilor studiate, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între 1.5 și 4.0 (în condițiile în care, nota „1” s-a acordat pentru „fructe foarte mici”, iar „5” pentru „fructe medii”). Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor șase combinații a avut valoarea de 2.8 (aproape de nota „3”, care exprimă „fructe mici”).

În urma prelucrării statistice a datelor, doar variantele cu valori medii extreme pentru mărimea fructelor au prezentat abateri asigurate din punct de vedere statistic. Hibridii proveniți din încrucișarea Starkrimson x *M. prunifolia* au prezentat cele mai mari fructe, cu diferențe semnificativ superioare mediei pe experiență. Hibridii din combinația Reinette Baumann x *Malus zumi* au fost înregistrați cu cele mai mici fructe, cu diferențe foarte semnificativ inferioare.

În interiorul familiilor reprezentate de hibridii F<sub>1</sub> din cele 25 de variante, valoarea coeficientului de variabilitate (s%) a oscilat între 18.2% (*M. coronaria* x Reinette Baumann) și 70.7% (*M. prunifolia* x Rosu de Cluj). Variabilitatea amplă a mărimii fructelor la majoritatea combinațiilor studiate (peste 20%, doar o combinație fiind înregistrată cu s% sub 10), ilustrează diferențele marcante dintre hibridii aceleiași familii, pentru mărimea fructelor, fapt evidențiat și de media pe experiență, s%=40.4%.

### **Rezultatele obținute privind comportarea hibridilor interspecifici la atacul principalelor boli**

În special în Occident și îndeosebi în SUA, mărul ornamental este foarte popular, mult utilizat în amenajarea peisajului (Sion, 1995; Jackson, 2003; de ienupăr și Mabblerley, 2006). Din păcate, și mărul ornamental, la fel ca cel cultivat pentru fructe, este vulnerabil la atacul mai multor boli, care pot afecta sănătatea pomilor și aspectul lor decorativ. Printre cele mai grave boli ale mărului se situează rapănul (*Venturia inaequalis*) și făinarea (*Podosphaera leucotricha*), care provoacă daune mari și în condițiile pedoclimatice din Transilvania (Sestras, 2003 a, b).

Din acest motiv, crearea unor soiuri ornamentale sau pentru fructe de desert reprezintă un obiectiv extrem de important de ameliorare. Progenii unor specii de măr ornamental pot oferi o bună bază de selecție pentru obținerea unor genotipuri rezistente, deoarece mulți descendenți pot poseda un nivel ridicat de rezistență pentru cele două boli (Bus et al., 2000; Sestras, 2004; Patrascu et al., 2006). De asemenea, hibridii proveniți din specii ornamentale pot fi folosiți în programele de lărgire a bazei

genetice a mărului, selecție recurentă, creșterea variabilității genetice și ameliorarea durabilă (Oraguzie et al., 2003, 2004).

Ținându-se seama de aceste considerente, în experiență s-a urmărit îndeosebi comportarea hibrizilor intrespecifici la atacul de rapăn (*Venturia inaequalis*) și făinare (*Podosphaera leucotricha*).

### Rezultatele obținute privind comportarea hibrizilor la atacul de rapăn

Rapănul mărului, cauzat de agentul patogen *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. este una dintre bolile care produc cele mai mari pagube în cultura mărului. Boala afectează frunzele și fructele, având un efect negativ marcant asupra producției de fructe și calității fructelor. Boala poate fi controlată prin tratamente fitosanitare, dar cu costuri și dificultăți considerabile, iar uneori, în funcție și de condițiile climatice, eficiența fungicidelor aplicate este relativă (Sestraș, 2004; Sestraș și colab., 2009).

Datorită faptului că rapănul constituie cea mai importantă boală la măr, crearea unor soiuri rezistente la rapăn a constituit unul dintre principalele obiective prevăzute în programele de ameliorare din lumea întreagă. Și în România, și îndeosebi în Transilvania, rapănul întâlnește condiții deosebit de favorabile de dezvoltare și răspândire, iar cele mai multe soiuri larg cultivate sunt foarte sensibile la atacul acestei boli (Sestraș, 2003). De aceea, și în țara noastră, rezistența la rapăn constituie unul din obiectivele centrale de ameliorare a mărului.

Valorile medii ale atacului de rapăn, la combinațiile de măr studiate în experiență în care speciile de *Malus* au participat ca genitori materni sunt prezentate în tabelul 6. Datele au fost prelucrate statistic (testul ANOVA), provenind din notele individuale acordate hibrizilor, pe parcursul a trei ani, pe scara de bonitare de la “0” (lipsa atacului) la “5” (atac foarte puternic), în condițiile infecției naturale, și în absența tratamentelor cu fungicide.

Atacul de rapăn a avut valori diferite în cadrul combinațiilor studiate, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între 0.38 și 1.87.

Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor șase combinații a avut valoarea de 1.05.

Comparativ cu media experienței, considerată variantă martor, valori asigurate din punct de vedere statistic s-au înregistrat la trei combinații hibride. Astfel, combinația *M. coronaria* x Reinette Baumann a avut cel mai mare atac mediu, cu abateri foarte semnificativ inferioare mediei pe întreaga experiență iar combinația *M. zumi* x Golden Delicious a înregistrat abateri inferioare mediei pe întreaga experiență în timp ce combinația *M. zumi* x Reinette Baumann a fost înregistrată cu cea mai mare rezistență, cu diferențe semnificativ superioare mediei pe experiență.

Tabelul 6

Atacul de rapăn la hibrizii F<sub>1</sub> de măr din combinațiile studiate \*

Nr. crt.	Combinația hibridă	Val. medii atac de rapăn	Diferența ±	t	Semnif.	Coef. Variab. (s%)
1	<i>M. zumi</i> x Golden Delicious	0.58	-0.47	-1.98	o	69.0
2	<i>M. zumi</i> x Reinette Baumann	1.39	0.33	0.91	-	95.6
3	<i>M. zumi</i> x Reinette Baumann	1.87	0.81	2.36	x	52.0
4	<i>M. coronaria</i> x Jonathan	1.00	-0.05	-0.21	-	47.2
5	<i>M. coronaria</i> x Reinette Baumann	0.38	-0.68	-3.93	ooo	38.5
6	<i>M. floribunda</i> x Reinette Baumann	1.11	0.06	0.30	-	17.2
	Media experienței (Mt.)	1.05	-	-	-	53.2

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Pozitive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

\*Legenda: aprecierea comportării hibrizilor la atacul de rapăn s-a efectuat prin bonitare, utilizându-se următoarea scară de notare:

- 0 = lipsa atacului;
- 1 = atac foarte slab;
- 2 = atac slab;
- 3 = atac mediu;
- 4 = atac puternic;
- 5 = atac foarte puternic.

Coeficienții de variabilitate calculați pentru atacul de rapăn la combinațiile testate au valori relativ mari, la toate combinațiile fiind peste 20%. Valoarea medie coeficientului de variabilitate s% pe experiență a fost de 53.2 %, iar limitele de variație s% pentru atacul de rapăn au oscilat între 17.2 % (*M. floribunda* x Reinette Baumann) și 95.6 % (*M. zumi* x Reinette Baumann).

Rezultă că, la combinația *M. coronaria* x Reinette Baumann, cu cel mai mic atac de rapăn, variabilitatea relativ mică în comparație cu cea înregistrată în alte familii hibride, ilustrează o anumită uniformitate a comportării bune a hibrizilor la rapăn, sub aspectul manifestării atacului.

În tabelul 7 sunt prezentate valorile medii ale atacului de rapăn la hibridii din combinațiile de măr în care speciile de *Malus* au participat ca genitori paterni.

La descendenții proveniți din încrucișări interspecifice cu specii rustice utilizate ca forme paterne, atacul de rapăn a avut valori diferite în cadrul combinațiilor, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între note medii de 0.53 și 3.52 pe familie.

Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor zece combinații a avut valoarea de 1.94.

Comparativ cu media experienței, considerată variantă martor, valori asigurate din punct de vedere statistic s-au înregistrat la șase combinații hibride, dintre acestea, trei remarcându-se prin sensibilitatea descendenților, iar trei prin toleranță sau chiar rezistența acestora la atacul de rapăn.

Astfel, combinațiile Cluj 218/2 x *M. niedzwetzkyana*, Frumos de Voinesti x *M. niedzwetzkyana*, Golden Delicious x *M. prunifolia* au avut cele mai mici valori ale notelor medii pentru atac, cu abateri foarte semnificativ inferioare mediei pe întreaga experiență.

La polul opus s-au situat hibridii din combinațiile Cluj 218/2 x *M. floribunda* și Frumos de Voinesti x *M. floribunda* care au înregistrat diferențe foarte semnificativ superioare mediei pe experiență, manifestând sensibilitate la această boală. Susceptibilitate la atac au prezentat și progenii din combinația Reinette Baumann x *M. floribunda*, înregistrați cu diferențe distinct semnificativ superioare ale mediei notelor pe experiență.

Coeficienții de variabilitate calculați pentru atacul de rapăn la combinațiile testate au avut valori relativ mari la toate combinațiile, cu s% de peste 20%. Valoarea medie a coeficientului de variabilitate pe experiență a fost de 52.4 %, iar limitele de variație s% pentru atacul de rapăn au oscilat între 23.3 % (Frumos de Voinesti x *M. floribunda*) și 85.2 % (Golden Delicious x *M. prunifolia*).

Atacul de rapăn la hibridii F<sub>1</sub> de măr din combinațiile studiate \*

Nr. crt.	Comb	Media rapan	Difer.	t	Semnif.	s%
1	Cluj 218/2 x <i>M. floribunda</i>	3.52	1.58	4.63	xxx	24.3
2	Frumos de Voinesti x <i>M. floribunda</i>	3.23	1.29	4.92	xxx	23.3
3	Reinette Baumann x <i>M. floribunda</i>	2.51	0.57	3.01	xx	24.4
4	Cluj 218/2 x <i>M. niedzwetzkyana</i>	1.13	-0.82	-3.79	ooo	66.6
5	Frumos de Voinesti x <i>M. niedzwetzkyana</i>	0.53	-1.42	-10.20	ooo	57.2
6	Reinette Baumann x <i>M. niedzwetzkyana</i>	1.74	-0.21	-0.65	-	64.3
7	Rosu de Cluj x <i>M. niedzwetzkyana</i>	2.10	0.15	0.48	-	52.3
8	Golden Delicious x <i>M. prunifolia</i>	1.00	-0.94	-3.51	ooo	85.2
9	Reinette Baumann x <i>M. prunifolia</i>	1.44	-0.50	-1.39	-	71.2
10	Rosu de Cluj x <i>M. prunifolia</i>	2.25	0.31	-	-	55.1
Media experienței (Mt.)		1.94	-	-	-	52.4

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Positive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

\*Legenda: aprecierea comportării hibridilor la atacul de rapăn s-a efectuat prin bonitare, utilizându-se următoarea scară de notare:

- 0 = lipsa atacului;
- 1 = atac foarte slab;
- 2 = atac slab;
- 3 = atac mediu;
- 4 = atac puternic;
- 5 = atac foarte puternic.

La combinația Frumos de Voinesti x *M. floribunda*, cu variabilitatea minimă, atacul de rapăn a avut și cea mai mare uniformitate sub aspectul manifestării, ilustrând o sensibilitate la rapăn a majorității hibridilor. În combinația Golden Delicious x *M. prunifolia*, înregistrată cu o medie mică a notelor, adică o comportare bună a hibridilor la rapăn, apare cea mai mare neuniformitate a atacului (s%=85,2), ceea ce semnifică faptul că pe lângă hibridi rezistenți, în familia respectivă există și unii extrem de sensibili la rapăn.

### Rezultatele obținute privind comportarea hibridilor la atacul de fâinare

Valorile medii ale atacului de fâinare la hibridii din combinațiile de măr studiate în experiență în care speciile de *Malus* au participat ca genitori materni sunt prezentate în tabelul 8.

La fel ca în cazul atacului de rapăn, și pentru atacul de fâinare, datele au fost prelucrate statistic (testul ANOVA), provenind din notele individuale acordate hibridilor, pe parcursul a trei ani, pe scara

de bonitare de la “0” (lipsa atacului) la “5” (atac foarte puternic), în condițiile infecției naturale, și în absența tratamentelor cu fungicide.

Atacul de făinare la hibridii F<sub>1</sub> a avut valori diferite în cadrul combinațiilor studiate, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între 0.42 și 1.47. Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor șase combinații a avut valoarea de 1.11.

Comparativ cu media experienței, considerată variantă martor, valori asigurate din punct de vedere statistic nu s-au înregistrat la nici o combinație. Cu toate acestea, se poate constata faptul că cei mai sensibili hibridi la făinare au fost cei din combinațiile M. zumi x Reinette Baumann și M. floribunda x Reinette Baumann (cu valori medii de 1,47 și 1,45).

Tabelul 8

Atacul de făinare la hibridii F<sub>1</sub> de măr din combinațiile studiate \*

Nr. crt.	Comb	Media făinare	Difer.	t	Semnif.	s%
1	M. zumi x Golden Delicious	1.00	-0.11	-0.51	-	40.7
2	M. zumi x Jonathan	1.06	-0.05	-0.23	-	70.9
3	M. zumi x Reinette Baumann	1.47	0.35	1.23	-	57.0
4	M. coronaria x Jonathan	1.28	0.17	0.53	-	55.8
5	M. coronaria x Reinette Baumann	0.42	-0.69	-1.61	-	82.0
6	M. floribunda x Reinette Baumann	1.45	0.33	1.34	-	26.7
Media experienței (Mt.)		1.11	-	-	-	75.2

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea ‘t’	Semnificațiile diferențelor		
	Positive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

\*Legenda: aprecierea comportării hibridilor la atacul de făinare s-a efectuat prin bonitare, utilizându-se următoarea scară de notare:

- 0 = lipsa atacului;
- 1 = atac foarte slab;
- 2 = atac slab;
- 3 = atac mediu;
- 4 = atac puternic;
- 5 = atac foarte puternic.

Coefficienții de variabilitate calculați pentru atacul de făinare la combinațiile testate au avut valori relativ mari, de peste 20% în toate combinațiile.

Valoarea medie a coeficientului de variabilitate s% pe experiență a fost de 75.2 %, iar limitele de variație s% pentru atacul de făinare au oscilat între 26.7 % (M. floribunda x Reinette Baumann) și 82.0 % (M. coronaria x Reinette Baumann).

Valorile medii ale atacului de făinare, la hibridii din combinațiile de măr cu genitori paterni reprezentați de specii rustice de *Malus*, studiați în experiență sunt prezentate în tabelul 9.

Atacul de făinare la hibridii F<sub>1</sub> a avut valori diferite în cadrul combinațiilor studiate, obținându-se o amplitudine a variației cuprinsă între 0.77 și 2.02. Media experienței pentru caracteristica analizată în rândul celor zece combinații a avut valoarea de 1.46.

Comparativ cu media experienței, considerată variantă martor, valori asigurate din punct de vedere statistic s-au înregistrat la patru combinații, în două descendenții putând fi considerați sensibili, iar în două rezistenți (sau cel puțin toleranți) la atacul de făinare.

Cei mai sensibili hibrizi, cu cea mai mare valoare a mediei notelor (2,02), au fost cei din combinațiile Cluj 218/2 x M. niedzwetzkyana și Rosu de Cluj x M. prunifolia.

Valorile cele mai mici ale mediei notelor au fost înregistrate la hibridii din combinațiile Cluj 218/2 x M. niedzwetzkyana (0,77) și Reinette Baumann x M. floribunda (1,01), cu diferențe asigurate statistic, care ilustrează o comportare adecvată la făinare, respectiv rezistență sau toleranță la boală.

Tabelul 9

Atacul de făinare la hibridii F<sub>1</sub> de măr din combinațiile studiate\*

Nr. crt.	Comb	Media făinare	Difer.	t	Semnif.	s%
1	Cluj 218/2 x M. floribunda	1.47	0.01	0.03	-	73.8
2	Frumos de Voinești x M. floribunda	1.57	0.10	0.22	-	94.7
3	Reinette Baumann x M. floribunda	1.01	-0.45	-2.74	oo	55.9
4	Cluj 218/2 x M. niedzwetzkyana	0.77	-0.69	-3.86	ooo	81.8
5	Frumos de Voinești x M. niedzwetzkyana	1.25	-0.21	-0.77	-	72.8
6	Reinette Baumann x M. niedzwetzkyana	1.40	-0.06	-0.28	-	50.3
7	Rosu de Cluj x M. niedzwetzkyana	2.02	0.56	3.19	xx	28.5
8	Golden Delicious x M. prunifolia	1.81	0.34	0.91	-	71.0
9	Reinette Baumann x M. prunifolia	1.30	-0.17	-0.73	-	49.0
10	Rosu de Cluj x M. prunifolia	2.02	0.56	2.31	x	44.9
Media experienței (Mt.)		1.46	-	-	-	62.3

\*Explicarea semnificațiilor diferențelor

Valoarea 't'	Semnificațiile diferențelor		
	Positive	Negative	Interpretarea diferențelor
< t 5%	-	-	Nesemnificative (NS)
Între t 5% și t 1%	x	o	Semnificative
Între t 1% și t 0.1%	xx	oo	Distinct semnificative
> t 0.1%	xxx	ooo	Foarte semnificative

\*Legenda: aprecierea comportării hibridilor la atacul de făinare s-a efectuat prin bonitare, utilizându-se următoarea scară de notare:

- 0 = lipsa atacului;
- 1 = atac foarte slab;
- 2 = atac slab;
- 3 = atac mediu;
- 4 = atac puternic;
- 5 = atac foarte puternic.

Coeficienții de variabilitate calculați pentru atacul de făinare la combinațiile hibride din experiență au avut valori foarte mari, ilustrând diversitatea mare a reacției plantelor hibride din aceeași familie la atacul de rapăn, respectiv faptul că în interiorul familiilor hibride pot fi întâlniți atât descendenți sensibili, cât și rezistenți (toleranți).

În funcție de media notelor din familiile hibride, șansele identificării unor hibrizi rezistenți sunt mai mari în combinațiile cu valori medii mici ale atacului.

Valorile ample ale coeficientului de variabilitate s% ilustrează însă faptul că hibridi rezistenți pot fi selecționați în oricare combinație hibridă. Media s% pe experiență a fost de 62.3%, iar limitele de variație pentru atacul de făinare între variante (reprezentate de combinațiile hibride) au oscilat între 28.5 % (Roșu de Cluj x *M. niedzwetzkyana*) și 94.7% (Frumos de Voinesti x *M. floribunda*).

Valorile cele mai mari (2.02) pentru infecția cu făinare, obținute la descendenții din încrucișările Roșu de Cluj x *M. niedzwetzkyana* și Roșu de Cluj x *M. prunifolia* se datorează probabil faptului că hibridii rezultați din încrucișările respective au moștenit sensibilitatea la atacul de făinare de la Roșu de Cluj, un soi a cărui sensibilitate provine de la Jonathan, unul dintre genitorii săi, recunoscut pentru susceptibilitatea accentuată la făinare (Sestras, 2004).

Posibilele efecte maternale în urma hibridărilor efectuate au fost evaluate prin compararea valorilor medii pentru infecția cu făinare când speciile ornamentale au fost folosite atât ca forme maternale cât și paternale. S-a emis ipoteza că hibridii care au prezentat rezistență mai mare au moștenit-o de la donatorii de rezistență (speciile sălbatice) care au fost folosite ca formă maternă, ipoteză care însă nu a fost demonstrată statistic, deoarece nu au fost efectuate hibridări directe și reciproce între speciile ornamentale și cultivaruri (soiuri).

### **Alegerea plantelor elită din cadrul descendenților hibridi F<sub>1</sub> și intensitatea selecției**

În urma criteriilor de alegere aplicate și a selecțiilor efectuate, dintre hibridii interspecifici F<sub>1</sub> au fost aleși ca plante elită cei care au prezentat caracteristici superioare. Acestea au fost reprezentate de elementele prezentate (vigoare, timpurietatea intrării pe rod, mărimea fructelor, comportare adecvată – rezistență sau toleranță – la atacul de rapăn și făinare), precum și alte particularități valoroase (ideotip arhitectural adecvat, calitatea fructelor, în special gust corespunzător etc.).

După cum s-a precizat, hibridii au moștenit în mod preponderent caracteristicile de rusticitate de la genitorii sălbatici (formele „crabe”, ornamentale). De aceea, alegerea hibridilor cu particularități superioare a presupus aplicarea unei selecții riguroase, un număr mic de descendenți îndeplinind cerințele cumulate pentru ansamblul particularităților valoroase, respectiv vigoare și ideotip arhitectural al pomilor adecvat, intrare timpurie pe rod, fructe de dimensiuni suficient de mari pentru merele de desert și calitate gustativă bună, comportare bună la atacul de rapăn și făinare (rezistență, eventual toleranță).

În tabelul 10 sunt prezentate rezultatele obținute în privința numărului de elite selecționate în cadrul combinațiilor hibride din experiență, precum și proporția elitelor alese din fiecare combinație (familie hibridă) și proporția acestora din totalul hibridilor analizați.

Din totalul celor 25 de familii hibride, în 16 nu a fost identificată nici măcar o plantă elită, ceea ce reprezintă o proporție mare a combinațiilor în care selecția nu a fost încununată de succes (64,0%).

În cele nouă combinații în care au fost identificate plante corespunzătoare obiectivelor de selecție stabilite, numărul elitelor a oscilat de la 1 la 12.

Cu toate că numărul cel mai mare de elite (12) s-a obținut în combinația ‘Cluj II-1-2’ x *M. niedzwetzkyana* (4,8%), proporția cea mai mare de elite s-a înregistrat în familia *M. floribunda* x ‘Reinette Baumann’ (nouă elite din 42 hibridi F<sub>1</sub>, ceea ce reprezintă 21,4%).

Ca atare, se poate aprecia că cea mai eficientă selecție au asigurat-o combinațiile hibride *M. floribunda* x ‘Reinette Baumann’ (21,4%), ‘Reinette Baumann’ x *M. niedzwetzkyana* (18,4%), *M. zumi* x ‘Reinette Baumann’ (7,3%), urmate de ‘Frumos de Voinesti’ x *M. niedzwetzkyana* (6,6%), ‘Cluj II-1-2’ x *M. niedzwetzkyana* (4,8%), *M. coronaria* x ‘Jonathan’ (4,5%), ‘Cluj 218/2’ x *M. floribunda* (3,2%).

Tabelul 10

Numărul elitelor selecționate în cadrul combinațiilor hibride din experiență și intensitatea selecției

Nr. crt.	Combi-nația hibridă (♀ x ♂)	Nr de hibrizi F1	Nr de elite alese	% Elite selecționate	
				Pe combi-nație	Pe total hibrizi F1
1	<i>M. coronaria</i> x 'Jonathan'	154	7	4.5	13.2
2	<i>M. coronaria</i> x 'Reinette Baumann'	86	0	0.0	0.0
3	<i>M. floribunda</i> x 'Reinette Baumann'	42	9	21.4	17.0
4	<i>M. prunifolia</i> x 'Rosu de Cluj'	29	0	0.0	0.0
5	<i>M. zumi</i> x 'Golden Delicious'	67	0	0.0	0.0
6	<i>M. zumi</i> x 'Jonathan'	134	0	0.0	0.0
7	<i>M. zumi</i> x 'Reinette Baumann'	82	6	7.3	11.3
8	'Ardelean' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	97	0	0.0	0.0
9	'Cluj 218/2' x <i>M. floribunda</i>	31	1	3.2	1.9
10	'Cluj 218/2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	97	1	1.0	1.9
11	'Cluj 218/2' x <i>M. zumi</i>	102	0	0.0	0.0
12	'Cluj II-1-2' x <i>M. floribunda</i>	17	0	0.0	0.0
13	'Cluj II-1-2' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	248	12	4.8	22.6
14	'Frumos de Voinești' x <i>M. floribunda</i>	98	1	1.0	1.9
15	'Frumos de Voinești' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	137	9	6.6	17.0
16	'Frumos de Voinești' x <i>M. zumi</i>	65	0	0.0	0.0
17	'Golden Delicious' x <i>M. prunifolia</i>	131	0	0.0	0.0
18	'Reinette Baumann' x <i>M. floribunda</i>	142	0	0.0	0.0
19	'Reinette Baumann' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	38	7	18.4	13.2
20	'Reinette Baumann' x <i>M. prunifolia</i>	76	0	0.0	0.0
21	'Reinette Baumann' x <i>Malus zumi</i>	21	0	0.0	0.0
22	'Rosu de Cluj' x <i>M. coronaria</i>	29	0	0.0	0.0
23	'Rosu de Cluj' x <i>M. niedzwetzkyana</i>	126	0	0.0	0.0
24	'Rosu de Cluj' x <i>M. prunifolia</i>	117	0	0.0	0.0
25	'Starkrimson' x <i>M. prunifolia</i>	24	0	0.0	0.0
Total hibrizi/elite		2190	53	Intensitatea selecției =2.42% (I%=Nr. elite/Nr. hibrizi F1)	

În restul combinațiilor care au permis alegerea unor descendenți valoroși, a fost identificată doar câte o plantă considerată elită (1%): 'Cluj 218/2' x *M. niedzwetzkyana* și 'Frumos de Voinești' x *M. floribunda*.

Intensitatea selecției (I%) s-a calculat cu ajutorul formulei:

$$I\% = \text{Nr. elite selecționate} / \text{Nr. hibrizi F}_1$$

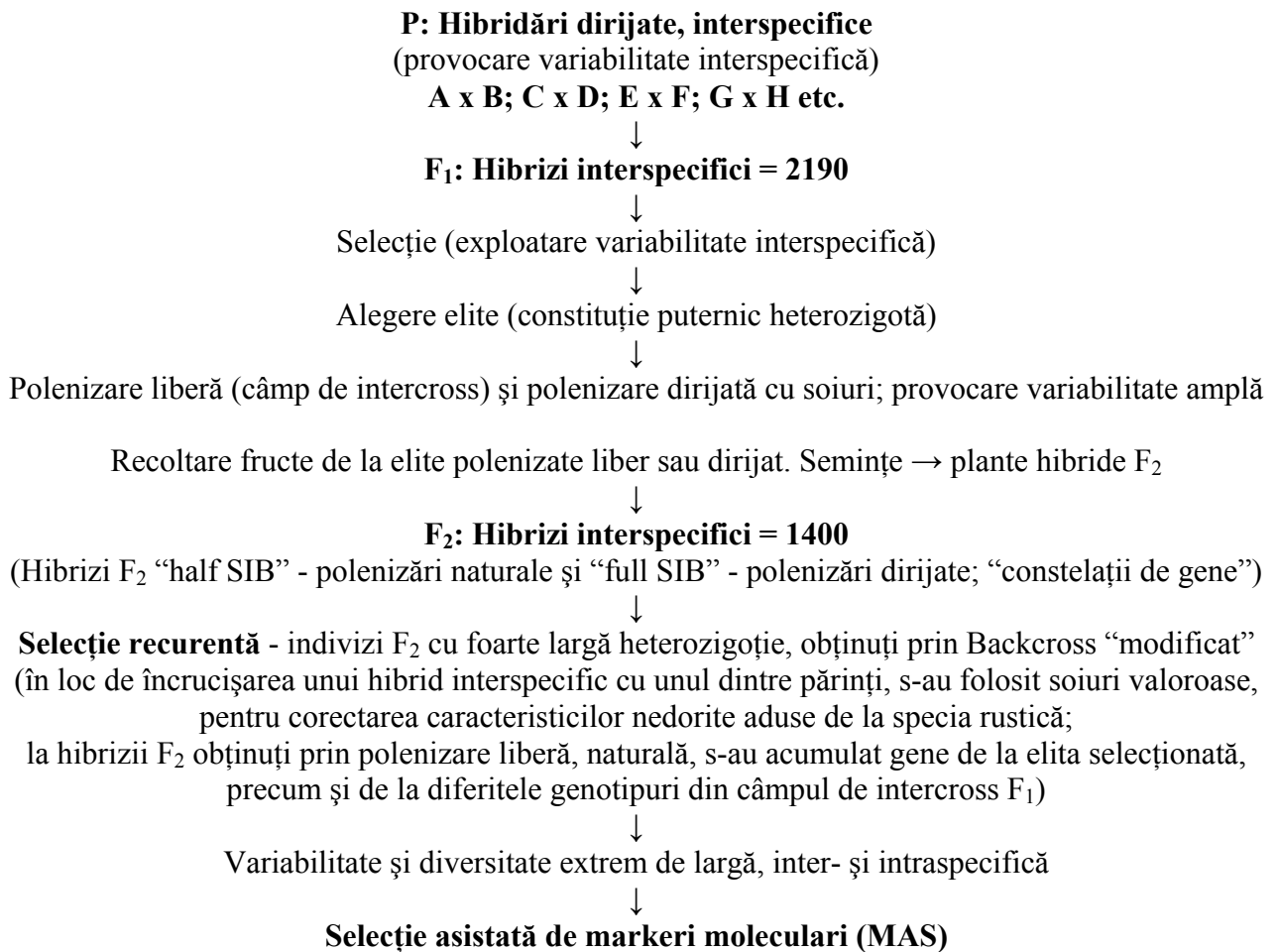
Pe întreaga experiență, intensitatea selecției a fost de 2.42%, o valoare relativ mică, însă justificată prin prisma faptului că selecția s-a efectuat în populații interspecifice, iar criteriile luate în considerare au vizat și particularități ale hibrizilor corespunzătoare mărilor pentru desert.

În câmpurile de hibrizi F<sub>1</sub>, plantele elită alese au fost lăsate să se polenizeze liber (29 elite), iar o parte dintre ele au fost polenizate artificial, dirijat, cu diferite soiuri (15 elite), alese pentru a completa anumite caracteristici mai puțin favorabile ale descendenților F<sub>1</sub> aleși ca elite.

După recoltarea fructelor și extragerea semințelor hibride, semințele au fost postmaturate și semănate în seră, iar după obținerea plantelor și călirea lor în câmp, hibridii F<sub>2</sub> au fost plantați în câmp.

În prezent, hibridii F<sub>2</sub> aflați la maturitate (1400 hibridi interspecifici, proveniți din 44 combinații, între 7 și 139 descendenți/combinăție), sunt analizați și supuși procesului de selecție fenotipică, genotipică și la nivel molecular.

În esență, modelul de selecție propus, ilustrat schematic mai jos (prezentat și în Fig. 2), care combină cele trei tipuri de selecție menționate (fenotipică, genotipică și la nivel molecular), este cu atât mai complex, cu cât este bazat pe selecția recurentă și MAS în populațiile hibride interspecifice de măr.



### Considerente privind complexitatea modelului de selecție și rezultate preconizate

În perspectiva îndepărtată, obiectivul stabilit prin proiectul propus este acela de creare a soiurilor ornamentale, dar și a unora de desert, rezistente la atacul principalelor boli ale mărilor (rapăn și făinare). În perspectiva apropiată, scopul urmărit este acela de a crea și valorifica un material hibrid F<sub>2</sub> cu foarte largă heterozigoție, reprezentat de descendenți seminali obținuți prin Backcross “modificat” (în loc de încrucișarea unui hibrid interspecific cu unul dintre părinți, s-au folosit soiuri valoroase, pentru corectarea caracteristicilor nedorite aduse de la specia rustică, iar la hibridii F<sub>2</sub> obținuți prin polenizare liberă, naturală, s-au acumulat gene de la elita selecționată, precum și de la diferitele genotipuri din câmpul de intercross F<sub>1</sub>).

În fine, variabilitate și diversitatea extrem de largă, inter- și intraspecifică, creată prin încrucișări dirijate, interspecifice, obținerea unor hibridi F<sub>2</sub> “half SIB” - polenizări naturale și “full SIB” - polenizări dirijate, are marele avantaj de a permite obținerea unor “constelații de gene” unice la noile genotipuri.

În acest fel, prin proiect se contribuie la îmbogățirea fondului de germoplasmă la măr, obținerea și promovarea unui material biologic cu o structură genetică heterozigotă, elaborarea unor metodologii de evaluare fenotipică, genotipică și la nivel molecular a resurselor genetice în scopul utilizării lor eficiente în viitor, în folosul umanității, aducându-se contribuții la eforturile mondiale în direcția diversificării sortimentului și evitării unor situații de criză la această importantă specie pomicolă. Aceasta, cu atât mai mult cu cât genul *Malus*, chiar dacă este foarte divers din punct de vedere genetic, prezintă vulnerabilitate și risc genetic datorită eroziunii genetice și bazei genetice restrânse, a fondului genetic îngustat continuu, datorită selecției efectuată de-a lungul timpului în direcția obținerii soiurilor de desert. Prin prezentul proiect se contracarează efectele negative și riscurile accentuate de limitarea resurselor genetice utilizate în ameliorarea mărilor în ultimul timp.

Rezultatele obținute în urma evaluării exhaustive a hibridilor F<sub>2</sub> în anul 2009, vor fi completate cu cele care vor fi înregistrate în anul 2010, 2011, urmând ca datele să fie prelucrate statistic, aplicându-se un model adecvat de analiză hibridologică.

La hibridii F<sub>2</sub>, în anul 2009, selecția s-a axat pe aceleași caracteristici urmărite la hibridii F<sub>1</sub>, înregistrându-se vigoarea hibridilor (înălțimea, diametrul trunchiului, număr de șarpante etc.), ideotipul arhitectural al pomilor, particularitățile fructelor, comportarea la atacul de rapăn și făinare etc. În mod deosebit, s-au luat în considerare particularitățile decorative ale hibridilor F<sub>2</sub>, între care, pe lângă caracteristicile de ansamblu ale pomilor și aspectul lor ornamental, s-au urmărit și abundența florilor, persistența acestora, valoarea lor decorativă (culoare, mărime, dispunere etc.), valoarea decorativă a fructelor (culoare, mărime, formă, epocă de maturare etc.).

### **Rezultate obținute în extracția ADN-ului și analizele moleculare**

De la hibridii de măr F<sub>2</sub> cu particularități decorative superioare, precum și de la ascendenții reprezentați de specii genitoare, s-a recoltat material biologic - frunze tinere, în pungi de polietilenă cu destinație specială, frunzele fiind păstrate în gheață până în momentul extracției ADN; fiecare probă a conținut minim 5 g frunze.

#### **Extracția ADN-ului**

Izolarea ADN-ului presupune separarea acestuia de ceilalți constituenți celulari. Există o gamă foarte variată de procedee de izolare de ADN. Ele se bazează pe anumite proprietăți fizice și biochimice ale constituenților celulari, cum sunt diferitele tipuri de ADN, proteine, membrane celulare, compuși poliglucidici și polifenolici etc., precum și pe modul diferit de interacțiune al acestora cu diverși reactivi chimici, enzime și sisteme fizice inerte.

Pentru început au fost studiate câteva din proprietățile ADN-ului și ale altor substanțe, precum și tipurile de interacțiune care fac posibilă izolarea ADN-ului.

Se poate concluziona că procesul de izolare a ADN-ului cuprinde trei etape majore, și anume:

1. Distrugerea integrității celulare (liza celulară) și eliberarea ADN-ului într-un omogenat (o “supă” ce conține toți constituenții celulari, mai mult sau mai puțin fragmentați), numit lizat celular.

2. Purificarea ADN de restul ADN-ului prezent eventual în lizat, precum și de ARN, proteine și alți compuși metabolici.

3. Obținerea ADN-ului în concentrația dorită și o puritate cunoscută

Izolarea ADN-ului s-a efectuat încercându-se mai multe variante de lucru, în final rezultate mai bune dând protocolul propus de Lodhi și colab., (1994), îmbunătățit ulterior de Rodica Pop, Ardelean, M., Pamfil, D., Ioana Marina Gaboreanu (2003) prin adăugarea în tamponul de extracție a următoarelor componente:

- 5mM acid ascorbic;
- 2% PVP;
- 4mM DIECA;
- Soluțiile stoc necesare extracției de ADN.

### **Protocolul extracției de ADN**

(după Lodhi și colab., 1994, îmbunătățit de Rodica Pop și colab., 2003)

Se mojarază frunzele în azot lichid. Se iau aproximativ 0,2 g de pulbere și se introduc într-un tub Eppendorf cu 700 μl de tampon de extracție încălzit la 65°C. Se agită ușor tuburile prin întoarcere de cca 20 de ori.

Se incubează tuburile la 65°C timp de 25 de minute.

Se adaugă în tuburi 700 μl de cloroform- alcool izoamilic. Se agită tuburile ușor până la formarea unei emulsii.

Se centrifughează tuburile la 11000 RPM timp de 15 minute la temperatura camerei.

Se transferă faza apoasă (supernatantul) într-un tub Eppendorf nou.

Se repetă pașii 3,4,5.

Se adaugă la supernatantul recuperat 225 μl de NaCl și se agită tuburile.

Se adaugă 600 μl de alcool etilic 95% răcit la -20°C și se refrigerază la 4°C timp de 15-20 minute sau până când ADN-ul precipitat devine vizibil.

Se centrifughează la 3000 RPM timp de 3 minute, după care se crește viteza la 11000 RPM timp de 5 minute.

Se îndepărtează supernatantul și se spală sedimentul cu alcool etilic 76% (700 μl) răcit la 0-4°C.

Se centrifughează 5 minute la 10000 RPM.

Se repetă pasul 10 dacă este necesar.

Se îndepărtează alcoolul etilic prin incubarea tuburilor deschise timp de 20-30 minute 37°C.

Se dizolvă sedimentul în 50-100 μl TE

ADN-ul se păstrează la - 70°C pe timp lung sau la - 20°C pe timp scurt.

### **Obținerea lizatului (extractului celular)**

Există numeroase metode de a liza, eficient celulele. În trecut, țesuturile erau mojarate cu nisip de cuarț sau cu o sticlă pisată, într-un tampon (soluție) de liză. În prezent, mojararea materialului biologic se face, în urma înghețării sale cu azot lichid (- 196°C). Înghețarea instantanee cu azot lichid face materialul casant, iar mojararea sa, îl transformă repede într-o pudră fină.

Odată cu distrugerea integrității celulelor, în lizat, este eliberată și întreaga gamă de enzime de care dispun celulele. Printre acestea se numără și ADN-azele, care, scăpate de sub controlul celular, pot fragmenta drastic moleculele de ADN, făcându-le inutilizabile pentru aplicații ulterioare. Folosirea de azot lichid reduce activitatea enzimatică. Protecția ulterioară a ADN-ului este asigurată de tamponul de liză. Acesta conține EDTA (acid etilendiaminuteotetraacetic), care este un compus chelator ai ionilor de Ca<sup>2+</sup> și Mg<sup>2+</sup> din soluție. În absența ionilor de Mg<sup>2+</sup>, ADN-azele sunt inhibate. EDTA este, deci, un

component esențial al soluțiilor de liză. Un alt efect al sechestrării ionilor de  $Mg^{2+}$  de către EDTA este slăbirea peretelui celular pecto-celulozic al celulelor vegetale, ceea ce are drept urmare facilitarea lizei celulare. Ionii de  $Mg^{2+}$  joacă un rol important în menținerea arhitecturii peretelui celular.

Liza celulară presupune dezintergrarea membranei plasmatică a celulelor. Mojararea singură, nu este suficientă și, de aceea, o gamă variată de detergenți sunt folosiți ca ingrediente esențiali ai tamponelor de liză. Dintre aceștia putem enumera SDS (dodecilsulfat de sodiu), CTAB (bromură de cetiltrimetilamoniu), Sarkosyl (N-lauroylsarcosină), Triton X-100 etc. Detergenții interacționează cu fosfolipidele din bistratul membranei plasmatică, dezorganizând-o.

Toate soluțiile de liză sunt tamponate, asigurând un pH constant de-a lungul procesului. Tamponarea (menținerea unui pH constant) este realizată, de obicei, de către Tris- HCl, prezent în soluție. Alți agenți de tamponare, cum sunt MOPS (acid 3-N-morfolinopropansulfonic), fosfat de sodiu, acetat de sodiu etc. sunt, de asemenea, folosiți în soluțiile pentru izolarea ADN-ului. Menținerea constantă a pH-ului este importantă, știut fiind că ADN-ul se poate denatura la Ph-uri acide sau bazice. Soluția finală de ADN se realizează în funcție de specificul metodei de preparare, fie prin resuspendarea sedimentului de ADN, în urma precipitării sale cu alcoolii (etanol sau isopropanol) în prezență de săruri, fie prin eluarea ADN-ului direct în soluție, de pe diferite structuri fizice în urma purificării (rășini, membrane, particule de sticlă). De obicei, ADN-ul se pastrează în soluție TE, sau în apă sterilă, deionizată.

Soluțiile se păstrează în frigider, sau în congelator. În cazul păstrării pe perioade îndelungate, de luni sau ani, este recomandată păstrarea la  $-20^{\circ}C$ .

#### **Cuantificarea ADN-ului**

Metoda cea mai uzuală de apreciere a purității ADN-ului este cea spectrofotometrică. Este cunoscut că marea majoritate a substanțelor biologice au absorbție caracteristică în domeniul radiațiilor ultraviolete (UV). Banda de absorbție a moleculelor biologice în UV este destul de largă, între 200 și 400 nm. Vârfulurile de absorbție sunt însă destul de caracteristice pentru diferite clase de substanțe. Proteinele, care constituie contaminantul major al soluțiilor de ADN, au un maxim de absorbție de 280 nm. ADN este considerat suficient de pur, dacă raportul celor două citiri (  $A_{260}$ -  $A_{280}$ ) dă o valoare între 1.8 și 2.0. Valori mai mari de 2.0 indică impurificarea cu ARN, iar valori mai mici de 1.8 indică impurificarea cu proteine sau fenol.

#### **Obținerea diluțiilor de ADN**

În urma obținerii prin metoda spectrofotometrică cu aparatul Eppendorf Biophotometer, a concentrației și a purității de ADN la cele 10 de probe biologice luate în studiu, au fost necesare realizarea unor diluții ale ADN-ului, diluții folosite ulterior în cadrul amplificării acestuia.

Astfel că pentru fiecare probă în parte s-au făcut două citiri la spectrofotometru. Media concentrației de ADN obținută în urma celor două citiri la aparatul Eppendorf Biophotometer a fost împărțită la concentrația dorită de ADN în amestecul PCR respectiv 50 ng. Rezultatul obținut în urma acestei împărțiri este reprezentat de factorul de diluție. Volumul final dorit (100  $\mu$ l) a fost împărțit la factorul de diluție rezultând un anumit volum de ADN ( $\mu$ l ADN). La volumul de ADN obținut s-a adăugat un anumit volum de TE (TrisEDTA) obținându-se volumul de lucru de 100  $\mu$ l, constituind de altfel diluția de ADN folosită în vederea amplificării acestuia.

### **Aprecierea purității și a cantității de ADN**

Aprecierea purității și a cantității de ADN s-a realizat prin metoda spectrofotometrică cu aparatul Eppendorf Biophotometer. În urma extracției de ADN de la 56 de probe, s-au obținut rezultatele redate în tabelul 11 (citiri Nanodrop).

Amplitudinea variației pentru cantitatea și calitatea ADN-ului extras a avut valori diferite în cadrul variantelor experienței.

După cum s-a precizat, selecția fenotipică în generația F<sub>2</sub> a fost exhaustivă, avându-se în vedere atât caracteristicile decorative ale pomilor, cât și comportarea acestora la atacul de rapăn și făinare. La hibridii selecționați pentru caracteristicile ornamentale deosebit de favorabile în generația F<sub>2</sub>, diferențele pentru conținutul de ADN extras din frunzele tinere a oscilat între 30,79 ng/μl dsADN (Varianta 52) și 400,85 ng/μl dsADN (Varianta 24), unele probe fiind irelevante.. Raportul 260/280 (ADN/proteine) a avut limite cuprinse între 1,45 ADN/prot (Varianta 8) și 2,72 ADN/prot (Varianta 36).

Tabelul 11

Aprecierea cantității și purității de ADN la variantele analizate

Sample ID (Proba)	Date	ng/μl ds ADN	A260	A280	260/280	260/230
1	8/4/2009	186.06	3.721	1.809	2.06	2.54
2	8/4/2009	37.74	0.755	0.376	2.01	3.17
2	8/4/2009	42.34	0.847	0.412	2.06	2.45
3	8/4/2009	263.83	5.277	3.297	1.6	1.05
3	8/4/2009	192.65	3.853	1.787	2.16	2.04
4	8/4/2009	73.26	1.465	0.674	2.17	3.07
5	8/4/2009	134.87	2.697	1.32	2.04	2.24
6	8/4/2009	53.4	1.068	0.475	2.25	0.92
7	8/4/2009	68.67	1.373	0.647	2.12	1.52
8	8/4/2009	94.5	1.89	1.299	1.45	0.61
9	8/4/2009	64.83	1.297	0.783	1.66	1.15
10	8/4/2009	-7.89	-0.158	-0.258	0.61	-0.79
10	8/4/2009	-6.58	-0.132	-0.23	0.57	-0.6
10	8/4/2009	-5.87	-0.117	-0.218	0.54	-0.39
10	8/4/2009	13.76	0.275	0.024	11.36	0.23
11	8/4/2009	117.71	2.354	1.254	1.88	0.84
12	8/4/2009	103.34	2.067	0.976	2.12	0.81
13	8/4/2009	141.42	2.828	1.172	2.41	0.73
14	8/4/2009	70.85	1.417	0.593	2.39	0.86
15	8/4/2009	102.06	2.041	0.833	2.45	0.74
16	8/4/2009	156.35	3.127	1.646	1.9	1.07
17	8/4/2009	98.77	1.975	0.916	2.16	1.07
18	8/4/2009	103.79	2.076	0.89	2.33	1.07
19	8/4/2009	86.48	1.73	0.741	2.34	0.99
20	8/4/2009	104.78	2.096	0.816	2.57	1.1
21	8/4/2009	117.97	2.359	1.313	1.8	0.79
22	8/4/2009	227.57	4.551	2.303	1.98	1
23	8/4/2009	67.33	1.347	0.584	2.31	1.2
24	8/4/2009	400.85	8.017	4.939	1.92	1.14
25	8/4/2009	104.88	2.098	0.85	2.47	1.14
26	8/4/2009	131.77	2.635	1.003	2.63	1.04

27	8/4/2009	150.91	3.018	1.473	2.05	1.13
29	8/4/2009	74.68	1.494	0.3	1.97	0.92
30	8/4/2009	45.56	0.911	0.401	2.27	0.58
31	8/4/2009	100.97	2.019	0.641	2.15	1.03
32	8/4/2009	79.61	1.592	0.688	2.31	0.83
33	8/4/2009	133.83	2.677	1.252	2.14	1.35
34	8/4/2009	73.85	1.477	0.476	2.11	1.05
35	8/4/2009	91.36	1.827	0.716	2.55	0.69
36	8/4/2009	114.36	2.287	0.842	2.72	0.91
37	8/4/2009	-209.45	-4.189	-4.205	1	-30.86
37	8/4/2009	-209.03	-4.181	-4.191	1	-24.16
37	8/4/2009	-220.79	-4.416	-4.458	0.99	-41.49
38	8/4/2009	93.12	1.862	0.862	2.16	1.09
39	8/4/2009	79.62	1.592	0.791	2.01	0.66
40	8/4/2009	131.26	2.625	1.736	1.91	0.74
41	8/4/2009	85.07	1.701	0.862	1.97	1.1
42	8/4/2009	84.72	1.694	0.783	2.16	1.28
43	8/4/2009	104.59	2.092	0.922	2.27	1.13
44	8/4/2009	63.72	1.274	0.441	2.19	0.82
45	8/4/2009	172.65	3.453	1.646	2.1	0.89
46	8/4/2009	120.85	2.417	1.198	2.02	1.08
47	8/4/2009	99.45	1.989	0.941	2.11	1.23
48	8/4/2009	134.24	2.685	1.463	1.83	0.86
49	8/4/2009	72.79	1.456	0.563	2.59	0.73
50	8/4/2009	97.37	1.947	0.969	2.01	1.1
51	8/4/2009	73.86	1.477	0.476	2.11	1.05
52	8/4/2009	30.79	0.616	0.33	1.87	0.43
53	8/4/2009	44.25	0.885	0.428	2.07	0.68
54	8/4/2009	241.73	4.835	3.082	1.77	0.88
55	8/4/2009	44.32	0.886	0.519	1.71	0.41
56	8/4/2009	34.92	0.698	0.272	2.17	0.55

Cantitatea de ADN: ng/μl dsADN

Impurificări:

R260/280 (ADN/prot >1,7)

R260/230 (Resturi alcool <1,5)

320 (Polizaharide-contaminări <0,1)

## Amplificarea ADN-ului prin tehnica PCR

### Tehnica PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction), tradusă aproximativ prin “ reacția în lanț a polimerazei ”este o metodă *in vitro* pentru sinteza enzimatică a unor secvențe specifice de ADN. Ea folosește două amorse oligonucleotidice (secvențe monocatenare oligonucleotidice de ADN), care se leagă de secvențele lor omoloage de pe matrița de ADN fiecare pe câte una din cele două catene, astfel încât să flanceze regiunea de interes care trebuie amplificată. Prima amorsă este complementară cu secvența unei catene “în amonte” de regiunea de interes, iar a doua este complementară cu cealaltă catenă “în

aval” de regiunea de interes. Matrița de ADN (fragmentul ce conține secvența care va fi amplificată) este denaturată prin încălzire și incubată în prezența unui mare exces molar al ambelor amorse și al tuturor celor patru deoxinucleotide. Amorsele atașate la matriță formează scurte porțiuni dublu catenare amorsă-matriță.

### **Componentii reacției PCR**

Pentru a realiza o tehnică PCR, au fost necesare următoarele elemente, care formează amestecul de reacți:

ADN-ul care conține secvența ce urmează a fi amplificată;

Amorsele;

Cele patru feluri de nucleozide trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);

ADN polimeraza;

Soluția tampon în care toate aceste componente sunt amestecate.

Materialul de plecare este reprezentat de ADN-ul genomic, care este digerat cu o enzimă de restricție cu frecvență de tăiere redusă, astfel încât să rezulte fragmente relativ mari.

Taq polimeraza sintetizează catenele complementare matrițelor, adăugând nucleotide la capătul 3' al fiecărei amorse.

Noile catene servesc drept matrițe în următorul ciclu de sinteză (după denaturare), astfel încât numărul de fragmente se dublează, la fiecare ciclu de reacție.

Produsul amplificării este analizat într-un gel de agaroză.

Izolarea secvenței care trebuie amplificată nu este necesară, deoarece ea este diferită de către amorsele folosite. Cantitatea de ADN de la care se pornește amplificarea, poate fi foarte redusă. De obicei, mai puțin de un microgram de ADN genomic total este suficient, dar PCR poate fi folosită pentru amplificarea unor secvențe chiar dintr-o singură moleculă de ADN. Pentru o amplificare eficientă, secvența țintă trebuie să nu fie mai mare de circa 3 kb, deoarece Taq polimeraza devine instabilă din punct de vedere termodinamic după sinteza unei catene lungi de câteva kb și se desprinde de matriță. O condiție obligatorie pentru realizarea PCR este cunoașterea prealabilă a secvențelor care flanchează regiunea ce urmează a fi amplificată. Aceasta permite selectarea (sau construirea) amorselor potrivite, cu secvențe complementare secvențelor cunoscute din flancuri.

Amorsele sunt oligonucleotide sintetizate pe cale chimică, de lungime diferită (în funcție de specificul reacției) dar, de obicei, cuprinsă între 17-30 de baze. Există o serie de parametri și caracteristici de care proiectarea amorselor ține cont, în mod obligatoriu.

Astfel, amorsele trebuie să satisfacă următoarele cerințe:

Secvența amorselor trebuie să fie unică în regiunea ce urmează a fi amplificată. Aceasta asigură amplificarea unui fragment unic. În caz contrar, amorsele s-ar putea lega la mai multe sau la toate secvențele omoloage prezente în secvența țintă, ceea ce ar duce la amplificarea mai multor fragmente, într-un mod necontrolabil;

Amorsele trebuie să posede o clemă G/C de 1-2 nucleotide la capătul 3'. Capetele 3' ale amorselor sunt locurile unde începe sinteza produșilor PCR. Includerea unei baze G sau C la capătul 3' al amorsei ajută la realizarea unei atașări corecte la matriță, datorită legăturilor de hidrogen, mai puternice ale perechii G/C (față de A/T);

Amorsele trebuie să nu aibă porțiuni complementare în interiorul propriei secvențe, ceea ce ar duce la structuri parțial dublu catenare, care ar împiedica hibridizarea amorselor cu matrița;

Cele două amorse ale perechii folosite, trebuie să nu prezinte porțiuni complementare între ele. Formarea unor hibridi parțiali între cele două amorse, ar duce la formarea de “amorse-dimeri”, cauzatori de artefacte;

Compoziția în baze și distribuția acestora în amorsă trebuie să fie arbitrară; cu cât conținutul G/C este mai mare, cu atât temperatura de “topire” a amorselor (temperatura la care se desfac legăturile de hidrogen dintre bazele amorselor și ale matriței) este mai mare. Un procent de 50% G/C este ideal. De obicei se realizează un conținut G/C de 45-55%. Pentru un conținut mai mic este recomandabilă o lungime mai mare a amorselor, pentru a evita o temperatură de “topire” scăzută.

Temperatura de topire ( $T_m$ ) trebuie să fie aceeași pentru ambele amorse ale perechii. Altfel, la o anumită temperatură, una ar putea fi hibridată la matriță, iar cealaltă nu.

Amestecul de reacție PCR a fost preparat în hota sterilă pentru a evita contaminarea cu ADN străin, pe gheață și a fost repartizat în tuburi pentru PCR de 0,2 ml.

Amestecul de reacție de 25 de  $\mu$ l conține următoarele componente în concentrațiile folosite de Tartarini, S., și colab., (1999):

- 5x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega)
- $MgCl_2$  1,5 mM
- dNTP 200  $\mu$ M
- Primer F 0,2  $\mu$ M
- Primer R 0,2  $\mu$ M
- TAQ 0,6 U
- ADN 50 ng
- $H_2O$  până la volumul final de 25  $\mu$ l

Secvențele primerilor care au fost utilizați în reacțiile PCR în vederea amplificării materialului genetic, sunt prezentate mai jos:

#### Electroforeza

Electroforeza este un fenomen fizico-chimic de deplasare a particulelor purtătoare de sarcini electrice, sub influența unui câmp electric. Deplasarea electroforetică se face în mediu lichid sau fixat pe un mediu solid. (electron = substanță ce acumulează sarcini electrice prin frecare, phoresis = deplasare).

Într-un câmp electric uniform generat de doi electrozi, particulele încărcate electric se deplasează înspre electrozii de sarcină electrică opusă.

Metoda electroforetică se bazează pe separarea diferitelor specii de particule încărcate electric, prin migrarea diferențiată sub influența unui câmp electric.

În condiții standardizate ale mediului de migrare și ale câmpului electric, mobilitatea electroforetică depinde esențial de mărimea și forma moleculelor.

Deci, particulele încărcate electric aflate în migrare, de mărime mai mică se deplasează mai repede decât cele de mărime mai mare.

Electroforeza a fost observată ca fenomen la începutul secolului al XIX-lea, la deplasarea particulelor de argilă în apă, sub influența unui câmp electric. Ca metodă de separare în biologie a fost folosită pentru prima dată în 1931 pentru separare proteinelor.

Electroforeza în gel de agaroză și poliacrilamidă este o metodă standard de separare, identificare și purificare de fragmente de ADN (în soluție tampon, ADN-ul are o sarcină electrică netă negativă, deci poate migra electroforetic, îndreptându-se spre anod).

Gelurile sunt medii suport pentru soluția în care migrează ADN-ul. Gelurile de poliacrilamidă sunt utilizate pentru separarea unor fragmente mici de ADN de 5-500 bp. Puterea lor de rezoluție este foarte mare, fragmente de ADN, care diferă în mărime printr-o singură pereche de baze putând fi separate (esențial în determinarea secvenței ADN-ului). Față de gelurile de agaroză, gelurile de poliacrilamidă sunt mai dificil de preparat și de manipulat. Gelurile de agaroză, deși au o putere de rezoluție mai mică decât cele de poliacrilamidă, au o gamă de separare mult mai largă: fragmente de la 200 pb, până la aproximativ 50 Kb, în funcție de concentrația agarozei.

Agaroza este un amestec de poliglucide, obținute din agar. Agarul se extrage din specii de alge roșii (Rodophyta). Agaroza (sub forma pudră), disponibilă comercial, nu este complet naturală. Ea este contaminată cu alte poliglucide, săruri și proteine. Gradul de contaminare poate influența migrarea ADN-ului.

Prepararea gelurilor s-a făcut prin topirea agarozei 2% (pe baie marină sau microunde) în tamponul de electroforeză dorit, până la obținerea unei soluții clare, transparente. Această soluție caldă am turnat-o în matrița care va da forma gelului (după răcirea și solidificarea agarozei).

În timpul solidificării, catenele polimerilor glucidici se asociază prin răsucire, dând naștere unei structuri spațiale reticulate neregulate, ce edifică structura poroasă a gelului. Cu cât gelul este mai dens (concentrația agarozei mai mare), cu atât porii sunt mai mici, iar deplasarea moleculelor mai mari, mai anevoioasă.

Moleculele de ADN, care străbat gelul, se găsesc într-un mediu lichid, care este asigurat de tamponul de electroforeză. Există diferite soluții tampon de electroforeză. Cele folosite pentru migrarea moleculelor de ADN native, dublu catenare, conțin EDTA la pH 8.0 și Tris-acetat (TAE), ori Tris-borat (TBE) ori Tris- fosfat (TPE). Tamponurile sunt preparate ca soluții stoc și sunt păstrate la temperatura camerei.

TBE și TPE prezintă capacitate de tamponare mai mare decât TAE la migrări de durată și curenți mari.

Sursa de putere asigură curent continuu la bornele sale. Păstrarea constantă a tensiunii și intensității curentului electric, de-a lungul întregului proces este esențială pentru o electroforeză corectă. Pentru migrarea ADN-ului, un redresor de 200 V este ideal.

Migrarea fragmentelor liniare de ADN la voltaj redus este proporțională cu voltajul aplicat. Proporționalitatea nu se păstrează însă pentru puteri mari ale câmpului electric, iar gradul de separare scade. Rezoluția maximă de separare a ADN-ului în geluri de agaroză, pentru fragmente mari de 2 Kb, se obține nu la mai mult de 5 V/cm. Distanța este cea măsurată între electrozi și nu lungime gelului.

### **Prepararea gelului de agaroză**

Între concentrația agarozei în gel și separarea eficientă a moleculelor de ADN care migrează există o relație de proporționalitate. Cu cât concentrația agarozei este mai mare, cu atât separarea eficientă a fragmentelor de ADN se face la dimensiuni mai mici ale celor din urmă.

Aparatură și soluții:

Echipamentul complet de electroforeză

Agaroză

Soluție stoc de tampon de electroforeză

Micropipete și vârfuri sterile

Soluții necesare:

Soluție stoc TAE 50X:

TRIS BASE 242 g/l

Acid Acetic Glacial 57,1 ml/l

100 ml/l EDTA 0,5 M, pH 8

Se păstrează la temperatura camerei.

Soluția de lucru TAE 1X:

S-a obținut prin măsurarea a 20 ml din soluția stoc de TAE 50x completându-se până la un volum de 1000 ml cu apă distilată, având următoarele concentrații la componentele de bază:

40 mM Tris- Acetate

1 mM EDTA

Agaroză (Sigma)  
Apă bidistilată sterilă

### **Metoda de lucru**

S-a lipit marginea plăcii de plexiglas cu bandă adezivă, pentru a forma matrița de turnare a gelului. Placa de plexiglas trebuie să fie curată și uscată.

După pregătirea matriței de turnare a gelului, aceasta a fost așezată pe o porțiune perfect orizontală.

S-a preparat tamponul de electroforeză- TAE 1X suficient pentru a umple cuva de electroforeză și pentru prepararea gelului. Grosimea gelului nu trebuie să depășească 3-5 mm, volumul gelului se calculează prin înmulțirea suprafeței matriței cu grosimea sa. Este esențial ca din același volum total preparat să se folosească tamponul de electroforeză atât pentru prepararea gelului, cât și cel destinat cuvei pentru migrare, deoarece mici diferențe de pH sau concentrație ionică pot crea fronturi în gel, care afectează puternic mobilitatea fragmentelor de ADN.

În vasul Erlenmayer s-a turnat 100 ml tampon TAE 1X și 2 g de agaroză. Vasul s-a introdus în cuptorul cu microunde timp de două minute până la dizolvarea completă a agarozei (soluție limpede, transparentă). Nu s-a lăsat agaroză să fiarbă.

S-a lăsat să se răcească la 65°C, după care s-a turnat în matriță. Timp de 30 minute gelul preparat s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei. După solidificare, s-au scos cu grijă pieptenii și s-a îndepărtat banda adezivă de pe matriță. Gelul a fost așezat pe platforma cuvei de electroforeză. În cuvă s-a turnat tampon de electroforeză, astfel încât un strat aproximativ de 1 mm de lichid să fie peste gel.

### **Pregătirea probelor de ADN**

Cantitatea maximă de ADN, care poate fi încărcată într-un godeu, depinde de numărul de fragmente și de mărimea lor. Cantitatea minimă de ADN, care poate fi detectată prin fotografiere, într-un gel colorat cu bromură de etidiu este de 2 ng, într-o bandă lată de 5mm. Volumul maxim de încărcare este determinat de volumul godeului.

Probele au fost pipetate cu grijă la baza godeului, înlocuind treptat volumul de tampon din godeu. Colorantul folosit migrează electroforetic spre anod. Albastru de bromfenol migrează de circa 2,2 ori mai repede decât xilen-cianolul FF, indiferent de concentrația agarozei. Raportat la ADN, albastru de bromfenol migrează aproximativ cu aceeași viteză ca și fragmentele de ADN dublu catenare liniare.

Materiale și soluții:

Gelul așezat în cuva de migrare, în tamponul de electroforeză

Probele amplificate.

Tampon de încărcare- Brom Phenol Blue (albastru de brom fenol)

Se păstrează la temperatura camerei de 4°C- 2μl

Markerul ADN

100 bp DNA Step Ladder (Promega)

Concentrația finală 2 μg/μl

Se păstrează la - 20°C

Prepararea Ladderului ADN :

2 μl -100 bp DNA Step Ladder, 2 μl Brom Phenol Blue, 6 μl H<sub>2</sub>O PCR

Apă bidistilată sterilă

Bromură de Etidiu (EtBr) – 0,5 μg/μl

Metoda de lucru

Volumul final al probelor amplificate care au fost migrate a fost de 10  $\mu$ l (în funcție de volumul godeului și de cantitatea de ADN).

Fiecare probă a fost pipetată în câte un godeu, cu o micropipetă. Vârful pipetei a fost schimbat pentru fiecare probă în parte, ladderul fiind aplicat în primul godeu, ultimul godeu fiind reprezentat de controlul probelor amplificate și migrate.

Capacul cuvei a fost închis, iar apoi au fost conectate cablurile electrice: cel roșu la anod (-) și cel negru la catod (+).

Sursa de putere a fost programată la parametrii doriți respectiv 90 V timp de o oră, pornindu-se astfel migrarea. După pornire, la nivelul electrozilor sunt generate bule iar după câteva minute, frontul albastru de albastru de bromfenol trece din godeu în gel, în direcția anodului.

După expirarea timpului, gelul a fost colorat prin imersie într-o soluție de bromură de etidiu 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l timp de 20-30 de minute, pe un agitator mecanic. Soluția trebuie să acopere gelul în vasul sau cutia în care se face colorarea.

### Amplificarea și electroforeza ADN-ului prin migrare în gel de agaroză

Amplificarea și electroforeza ADN-ului prin migrare în gel de agaroză au evidențiat deosebiri marcante între variantele experimentale, reprezentate de hibridi intrespecifici  $F_2$  și unele specii de *Malus* utilizate ca genitori, cu o încadrare distinctă în clasele fenotipice urmărite pentru aspectul decorativ al pomilor (Figurile 4, 5, 6).

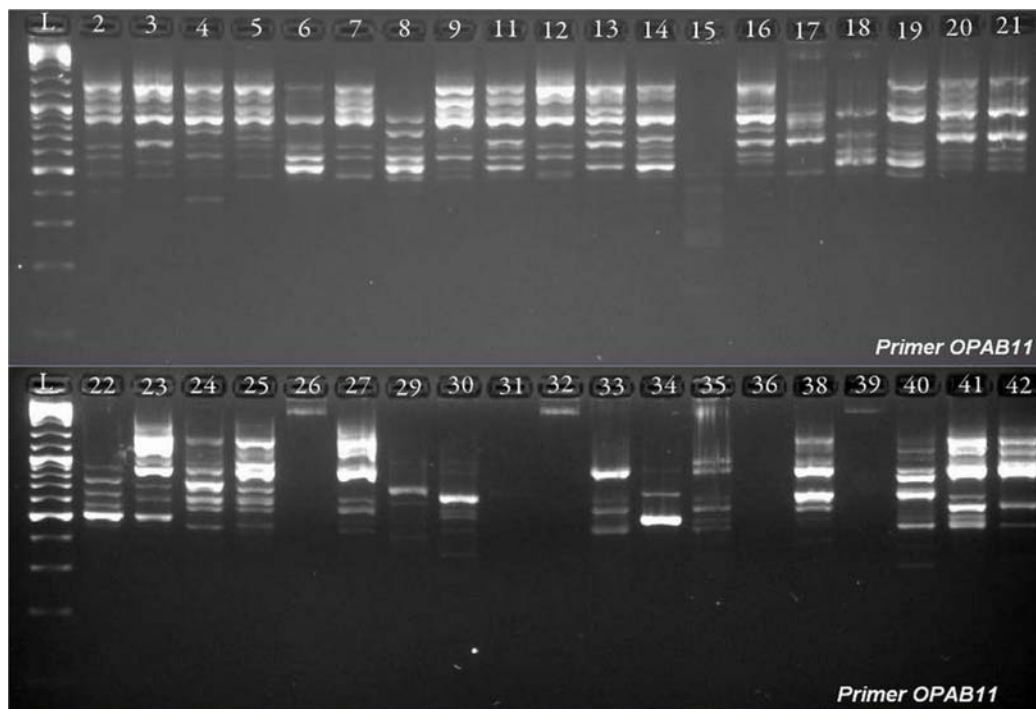


Fig. 4. Profilul electroforetic obținut în urma amplificării cu primerul OPAB 11

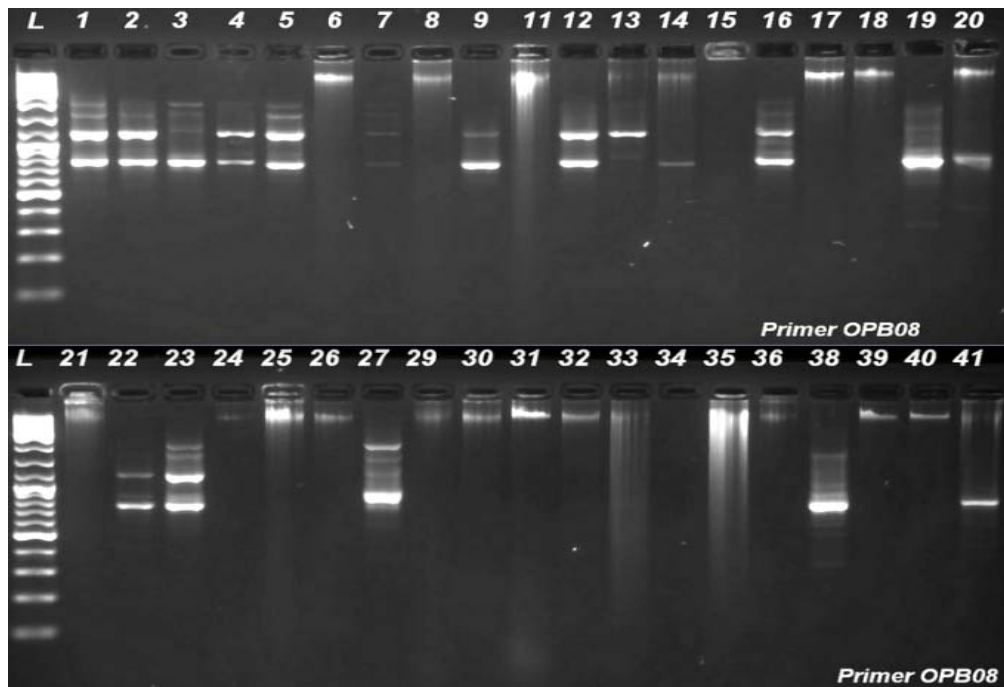


Fig. 5. Profilul electroforetic obținut în urma amplificării cu primerul OPB 08

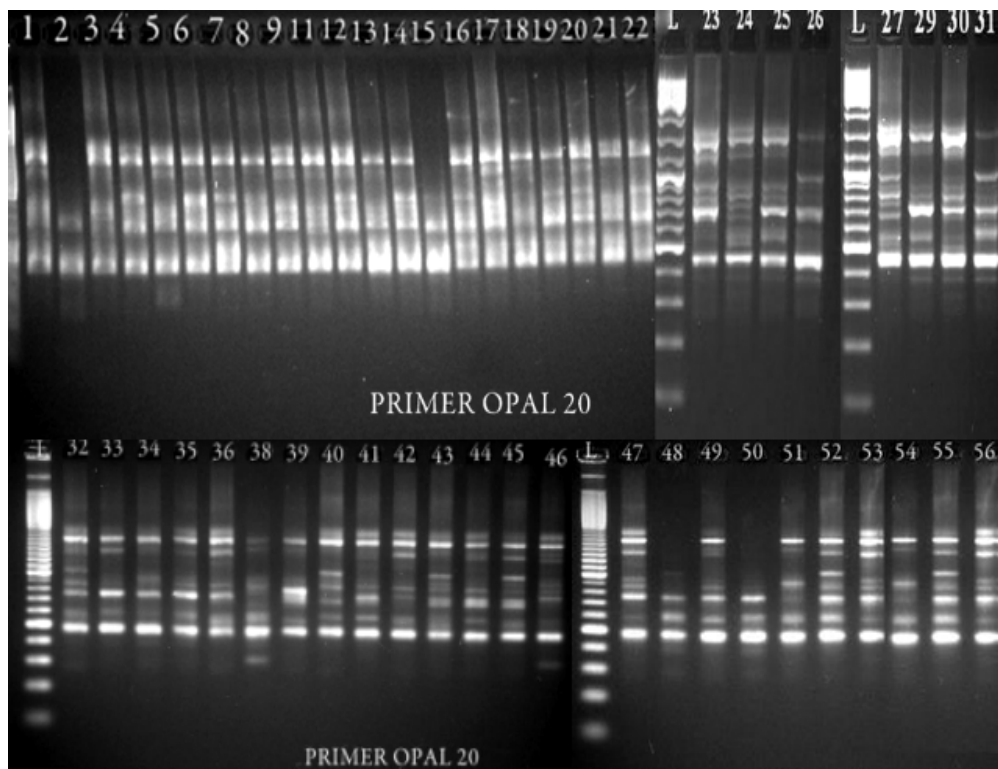


Fig. 6. Profilul electroforetic obținut în urma amplificării cu primerul OPAL 20

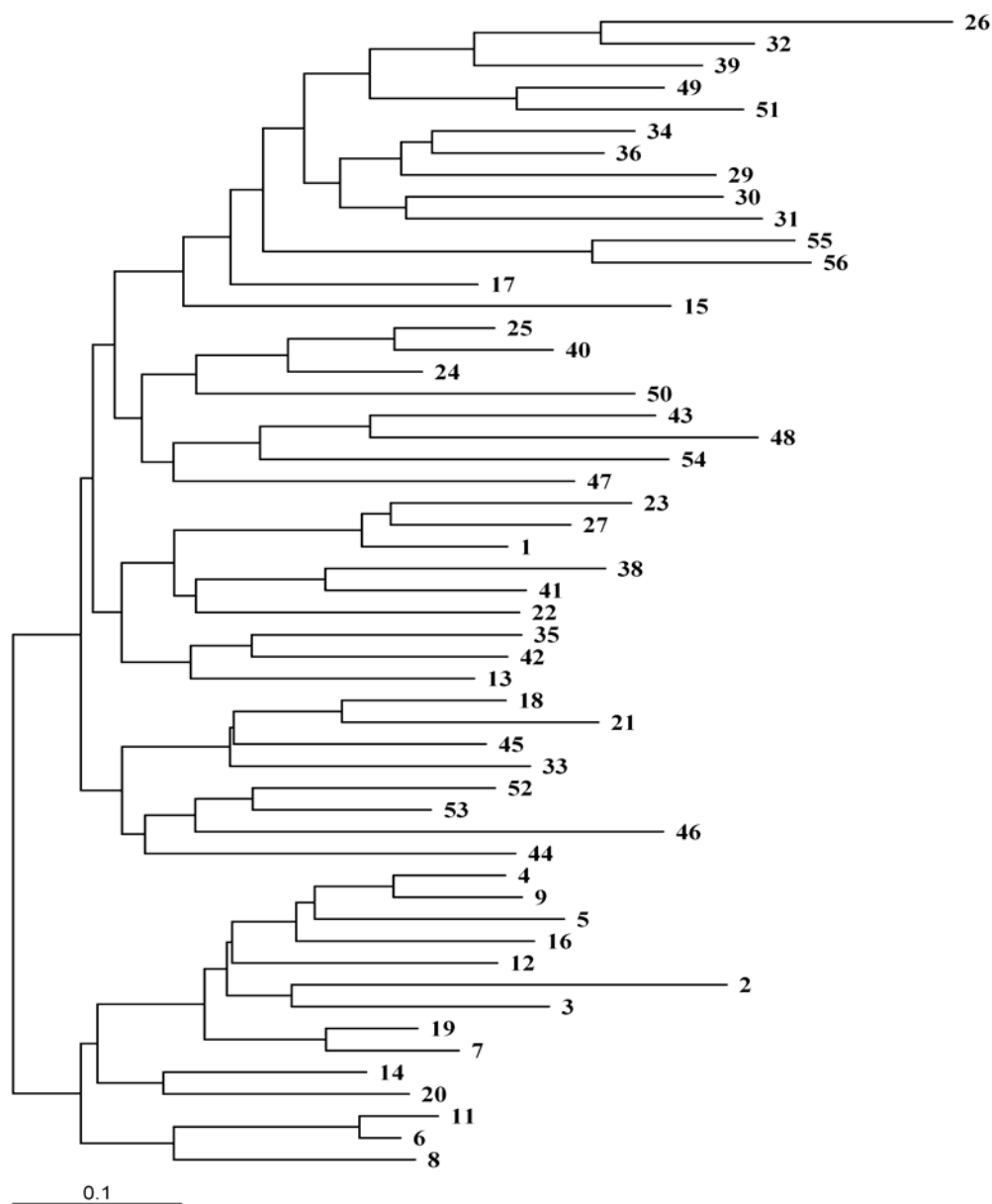


Fig. 7. Dendrograma pentru hibridii interspecifici  $F_2$  și specii utilizate ca genitori, realizată cu ajutorul tehnicii RAPD (ex. 2 - *Malus coronaria* x Jonathan; 55 - *M. zumi*)

Migrarea produșilor de amplificare demonstrează că primerii utilizați au asigurat evidențierea unui polimorfism accentuat, care denotă un fond de gene extrem de divers în rândul descendenților seminali obținuți din hibridările interspecifice  $P_1$  și intercross-ul hibridilor în  $F_1$ .

Diferențele genotipice evidente dintre hibridii selecționați fenotipic pentru aspectul decorativ deosebit de atrăgător este ilustrat și prin dendrograma din Figura 7. Markarea moleculară și identificarea relațiilor dintre hibridii  $F_2$  proveniți din încrucișările interspecifice și speciile ancestrale de *Malus* vor continua și cu alți primeri, în paralel cu analiza comparativă a descendenților cu speciile și soiurile genitoare.

## Bibliografie

1. Anon. (2003). UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants), Geneva, TG/192/1, Ornamental Apple (*Malus Mill.*) – Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability.
2. Ardelean, M., Sestras, R. and Cordea, M. 2002. Tehnica experimentală horticolă. Ed. AcademicPres, Cluj-Napoca. 104.
3. Botez, C., E. Marin and E. Tamas (1995). Genetica. Tipo Agronomia, Cluj-Napoca.
4. Bus, V., Bradley, S., Hofstee, M., Alspach, P., Brewer, L. and Luby, J. 2000. Increasing Genetic Diversity in Apple Breeding to Improve the Durability of Pest and Disease Resistance. *Acta Hort.* 538:185-190.
5. Fiala, J. L. (1994). Flowering Crabapples: The Genus *Malus*. Timber Press.
6. Gilman, E. F. and D. G. Watson (2007). *Malus* spp. Crabapple. [Online] cited at <http://hort.ufl.edu/trees/MALSPPA.pdf>.
7. Jackson, J. E. (2003). *Biology of Apples and Pears*. Cambridge University Press.
8. Janick, J., J. N. Cummins, S. K. Brown and M. Hemmat (1996). Apples. In: J. Janick and J. N. Moore (eds.). *Fruit breeding. Vol. I: Tree and tropical fruits*, p. 1-77. John Wiley and Sons Inc., New York.
9. Juniper B. E. and D. J. Mabberley (2006). *The Story of the Apple*. Timber Press.
10. Oraguzie, N.C., Whitworth, C., Alspach, P.A., Morgan, C.G.T. and Fraser, J. 2004. Progress, Prospects and Challenges in a Recurrent Selection Programme in Apple, *Acta Hort.*, 663:855-860.
11. Oraguzie, N.C., Whitworth, C., Fraser, J., Alspach, P.A. and Morgan, C.G.T. 2003. First Generation of Recurrent Selection in Apple: Estimation of Genetic Parameters. *Acta Hort.*, 622: 213-220.
12. Patrascu, B., Pamfil, D., Sestras, R., Botez, C., Gaboreanu, I., Barbos, A., Qin, C., Rusu, R., Bondrea I., Dirle, E. 2006. Marker Assisted Selection for Response Attack of *Venturia inaequalis* in Different Apple Genotypes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 34:121-133.
13. Schmidt, H. (1985). Observations on the length of the juvenile period in apple seedlings. *Acta Hort.* 159:31-34.
14. Sestras, R. 2003a. Response of Several Apple Varieties to Powdery Mildew (*Podosphaera leucotricha*) Attack in Central Transylvania Conditions. *J. Cen. Eur. Agri*, 4:347-354.
15. Sestras, R. 2003b. Response of Several Apple Varieties to Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Attack in Central Transylvania Conditions. *J. Cen. Eur. Agri*, 4:355-362.
16. Sestras, R. 2004. *Ameliorarea speciilor horticole*. Ed. AcademicPres, Cluj-Napoca. 334.
17. Shaughnessy D. and B. Polomski (2007). Crabapple. [Online] cited at <http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC1007.htm>
18. UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants), 2003, Ornamental Apple (*Malus Mill.*), Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability, Geneva.
19. Zion, R. L. (1994). *Trees for Architecture and Landscape*. John Wiley & Sons.

### Articole publicate / acceptate spre publicare, cu rezultate din grant

Articole publicate în reviste indexate ISI = 1:

SESTRAS, R., D. PAMFIL, A. SESTRAS, L. JÄNTSCHI, S. BOLBOACA, C. DAN, 2009, Inheritance of Vigour Tree in F1 Apple Interspecific Hybrids, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1):70-73. <http://notulaeobotanicae.ro/nbha/article/view/3155>

Articole acceptate spre publicare în reviste indexate BDI = 1:

SESTRAS, R., D. PAMFIL, M. ARDELEAN, A. SESTRAS, 2010, Response of F1 Interspecific Hybrids, Belonging to Different Ornamental Apple Species, to Apple Scab and Powdery Mildew Attack, *Acta Horticulturae* (in press).