

## CERCETĂRI PRIVIND SELECȚIA *IN VITRO* A UNOR GENOTIPURI DE ARBORI FORESTIERI REZISTENȚI LA STRES ABIOTIC

IONEL MIRANCEA

Institutul de Cercetări și Amenajări Silvice București

### REZUMAT

Cercetările efectuate au avut ca scop testarea fazelor de inițiere, multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la salcâm (*Robinia pseudacacia* L.), plopul alb (*Populus alba* L.) și plopul tremurător (*Populus tremula* L.) pe diferite medii de cultură și balanțe hormonale, pentru a determina capacitatea de multiplicare, rizogeneză și rezistență a explantelor speciilor luate în studiu la diverse concentrații de NaCl și CaCO<sub>3</sub> în vederea găsirii condițiilor optime de cultură, care să faciliteze realizarea acestor faze necesare în elaborarea tehnologiei de selecție *in vitro* pentru speciile luate în studiu.

La salcâm, o rată de multiplicare optimă s-a obținut pe mediul de cultură MS-1, cu o balanță hormonală alcătuită din BAP 0,7 mg/l, IBA, NAA 0,05mg/l și caseină hidrolizată 500 mg/l. La plopul tremurător mediul de cultură optim pentru multiplicare a fost WPM cu BAP 0,2 mg/l, IBA și NAA 0,05 mg/l, lizină 20 mg/l și sulfat de adenină 40 mg/l. La plopul alb o rată de multiplicare optimă s-a obținut pe mediul de cultură MS-1 sau WPM cu o balanță hormonală alcătuită din BAP 0,8 mg/l, IBA și NAA 0,05mg/l, în prezența lizinei 20 mg/l și sulfatului de adenină 40 mg/l. S-au determinat concentrațiile optime de clorură de sodiu și carbonat de calciu la care se pot multiplica și înrădăcina pentru selecția *in vitro* genotipurile de *Populus* și *Robinia*. Astfel, concentrațiile de clorură de sodiu la care se pot multiplica *in vitro* genotipurile de salcâm și plopii testați sunt de 8 g/l și respectiv 6 g/l, iar pentru carbonatul de calciu a fost de 100 g/l. A fost stabilită o strategie de selecție *in vitro* la unele genotipuri de salcâm, plopul alb și plopul tremurător rezistente la clorură de sodiu și carbonat de calciu.

**Cuvinte cheie:** selecția *in vitro*; genotipuri de arbori forestieri; stres abiotic;

### 1. INTRODUCERE

Selecția naturală are un rol important în procesul de adaptare al arborilor la condițiile de mediu. Aceasta se realizează prin supraviețuirea fenotipurilor care au cea mai mare capacitate de adaptare fără o diminuare accentuată a structurii genetice a populației de arbori, pentru că datorită polimorfismului ereditar pot apare noi forme de adaptare. Selecția promovează variațiile ereditare cu valoare de adaptare ridicată.

Plantele regenerate *in vitro* ar trebui să fie clone, dar s-a constatat că apar variații (morfologice, fiziologice, etc.), iar această variabilitate manifestată la plantele regenerate din culturi *in vitro* a fost numită “variabilitate somaclonală” (Larkin și Scowcroft - 1981, citați de Badea și Săndulescu, 2001).

Culturile *in vitro* de celule și organe vegetale permit reproiectarea strategiilor de ameliorare la arborii forestieri în scopul măririi eficienței genetice și economice. Ahuja (1986) indică mai multe sfere de interes ale culturilor *in vitro* de celule și organe la arborii forestieri din care și testele de selecție timpurii.

## 2. SCOP ȘI OBIECTIVE

Cercetările au urmărit să stabilească, în raport cu particularitățile biologice ale materialelor vegetale utilizate, biotehnologii (procoloale) de selecție la factori abiotici (saliinitate - NaCl, carbonați - CaCO<sub>3</sub>), prin culturi *in vitro* la unele genotipuri de arbori (*Populus*, *Robinia*), în vederea integrării acestor biotehnologii în programele de ameliorare genetică.

Experimentele efectuate au urmărit testarea capacității de supraviețuire a explantelor în fazele de inițiere, alungire - multiplicare și înrădăcinare *in vitro* la salcâm (*Robinia pseudacacia* L.), plopul alb (*Populus alba* L.) și plopul tremurător (*Populus tremula* L.) pe diferite medii de cultură, pentru a determina capacitatea de rezistență a explantelor speciilor luate în studiu la diverse concentrații de NaCl și CaCO<sub>3</sub>.

## 3. METODA DE CERCETARE

În vederea realizării de culturi *in vitro* este necesară o aseptie ridicată la nivelul camerei de prelevare și inoculare a explantelor, mediului nutritiv și vaselor de cultură utilizate.

Strategia de selecție s-a bazat pe utilizarea unor concentrații mari (letale sau subletale) de NaCl și CaCO<sub>3</sub>. Aceste substanțe provoacă stres ionic și/sau osmotic ce inhibă creșterea și dezvoltarea. Stresul care acționează asupra explantelor cultivate *in vitro* determină apariția variabilității somaclonale.

## 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### 4.1. Culturi *in vitro* la salcâm (*Robinia pseudacacia* L.)

Pentru a realiza culturi *in vitro* la salcâm s-au folosit ca surse de explante, arbori maturi aflați în repaus vegetativ sau în perioada de vegetație și plantule obținute prin

germinația aseptică a semințelor verzi sau mature.

Inițierea culturilor *in vitro* la salcâm a fost influențată de materialul biologic prelevat (în special starea fiziologică a explantului), metoda de sterilizare, mediul de cultură și balanța hormonală.

Explanțele de salcâm care au răspuns eficient la inițierea de culturi *in vitro*, au fost semințele mature scarificate.

Dintre agenții sterilizanți utilizați, clorura mercurică 0,2%, a dat rezultatele cele mai bune, atât sub aspectul contaminărilor, cât și sub cel al viabilității explantelor (în special pentru semințe), comparativ cu apa oxigenată și hipocloritul de sodiu.

Timpul optim de tratare cu clorură mercurică a fost de 60 minute pentru semințe și de 75 minute pentru segmentele nodale excizate în repausul vegetativ.

Infecțiile endogene, prezente în segmentele nodale prelevate de la arbori maturi, nu au fost înlăturate prin procedeele de sterilizare utilizate, acestea depinzând de gradul de contaminare al explantului utilizat (66 %). La semințe procentul de infecții a variat între 0 și 30%.

În etapa de alungire - multiplicare la salcâm pe mediul de cultură normal sau experimental, reactivitatea și viabilitatea explantelor a fost influențată de componența și concentrația balanței hormonale, mediul nutritiv, prezența sau absența factorului abiotic, durata și numărul pasajului. Astfel, la sfârșitul primului pasaj de multiplicare, viabilitatea explantelor a fost influențată negativ de mediul de cultură GD și concentrația ridicată de BAP (1,2 mg/l), tipul de explant (inoculii din semințe decorticate și segmente nodale, în special apexurile) și factorul abiotic stresant (NaCl 5 g/l).

Pasajul al doilea s-a realizat pe mediul de cultură (optim) MS-1 cu caseină hidrolizată 500 mg/l, BAP 0,7 mg/l, IBA și NAA 0,05 mg/l. După al doilea pasaj baza explantelor se hipertrofiază și apar 1-3 muguri. Aceștia se formează mai greu și în număr mai mic în variantele cu NaCl. Viabilitatea explantelor din variantele cu NaCl a variat în funcție de proveniența acestuia (sursa) și a fost de 40 % la semințele decorticate, 61% la semințele scarificate și 85 % la segmentele nodale. În prezența acestui factor abiotic, inoculii formează calus neorganogen, iar creșterea se reduce.

În timpul pasajului al treilea s-a testat clorura de sodiu în concentrație de 8 și 20 g/l, iar carbonatul de calciu la concentrația de 50 și 100 g/l. Viabilitatea explantelor s-a redus comparativ cu pasajul al doilea la cei doi factori abiotici. În pasajul patru, realizat pe mediul de cultură optim viabilitatea explantelor a fost de 100%. Creșterea numărului de pasaje a determinat o reducere a vigurozității explantelor (datorită și stresului hormonal) deoarece unele explante au o diminuare a ortotropismului și se manifestă tendința de vitrificare.

În experimentul al doilea s-a testat capacitatea de regenerare a lăstarilor de salcâm după expunerea în pasajul precedent la diferite concentrații de NaCl. Viabilitatea în condiții normale după expunerea la concentrația de 16 g/l a fost de 10 %, dar a crescut la 87,5 la concentrația de 6 g/l.

În experimentul al treilea s-a urmărit influența concentrației de 100 g/l a CaCO<sub>3</sub> asupra capacității de supraviețuire și regenerare a explantelor de salcâm în etapa de alungire-multiplicare. Pe mediul de cultură optim după expunerea la concentrația de

100 g/l CaCO<sub>3</sub> viabilitatea a fost de 85 %.

La controlul de toleranță al explantelor de salcâm pe NaCl (8 g/l) și CaCO<sub>3</sub> (100g/l), în etapa de multiplicare, viabilitatea a fost de 41,7 % și respectiv de 88,2 %. Lăstarii inoculați pentru rizogeneză *in vitro* s-au comportat diferit în funcție de originea acestora, mediul nutritiv și varianta hormonală aplicată.

Diferențierea de rădăcini s-a obținut pe mediul de cultură MS-1 1/2, care a inclus IBA 0,3-0,4 mg/l și NAA 0,1 mg/l, dar s-a observat o reactivitate neuniformă a lăstarilor pe aceeași formulă hormonală, ceea ce se explică prin complexitatea factorilor ce determină un anumit răspuns la condițiile *in vitro*, în primul rând la gradientul diferit al concentrației hormonilor endogeni prezenți în explantele inoculate.

Primul experiment de rizogeneză a avut în vedere testarea capacității de înrădăcinare a lăstarilor viabili din faza de multiplicare în care mediul de cultură a avut concentrații diferite de clorură de sodiu și carbonat de calciu, pe mediul optim de rizogeneză. Când lăstarii au fost recoltați din variantele de multiplicare care au avut o concentrație a clorurii de sodiu de 20 g/l, capacitatea de rizogeneză a fost nulă, chiar pe mediul optim de înrădăcinare.

Viabilitatea în condiții normale de înrădăcinare după expunerea la NaCl în concentrație de 10 g/l a fost de 22,2 %, dar a crescut la 37,5 la concentrația de 6 g/l. Carbonatul de calciu în concentrație de 100 g/l nu afectează puternic țesuturile explantului excizat de pe mediul de multiplicare, fapt ce a permis o înrădăcinare *in vitro* de până la 90 %.

Al doilea experiment de rizogeneză a avut în vedere testarea capacității de înrădăcinare a lăstarilor viabili din faza de multiplicare pe mediul de rizogeneză cu diferite concentrații de clorură de sodiu și carbonat de calciu. Concentrațiile clorurii de sodiu de 12, 16 și 20 g/l existente în mediul de rizogeneză nu a determinat formarea rădăcinilor, fapt ce arată că genotipurile de salcâm testate nu sunt rezistente la concentrații mari de clorură de sodiu. Concentrațiile clorurii de sodiu de 10, 8 și 6 g/l existente în mediul de rizogeneză a determinat formarea rădăcinilor la 10,0 %, 18,8 % și respectiv 33,3 %. Lăstarii de salcâm inoculați pe mediul de rizogeneză în prezența carbonatului de calciu în concentrație de 100 g/l a permis înrădăcinarea *in vitro* și la această concentrație (70%).

Etapa de transfer *in vivo*. Microbutașii înrădăcinați la sfârșitul fazei de înrădăcinare *in vitro* și transferați *in vivo*, pe un substrat steril format din pământ fertil și turbă (1:1) în condiții climatizate, au supraviețuit după 25 de zile 64 %.

#### 4.2. Culturi *in vitro* la plopul alb (*Populus alba* L.).

Explantele de plop alb care au răspuns satisfăcător la inițierea de culturi *in vitro*, au fost mugurii fără solzi protectori și segmentele nodale cu muguri axilari excizate de la arbori. Tipul de explant și data recoltării a influențat foarte mult viabilitatea și reactivitatea explantelor, ce a variat între 0 și 58 %.

Pentru multiplicare, la plopul alb este necesară o balanță hormonală cu o concentrație crescută de BAP la primele pasaje pentru formarea mugurilor și o concentrație

scăzută de BAP la următorul pasaj pentru alungirea acestora. O viabilitate mai mare a explantelor s-a realizat pe mediul de cultură WPM (80-90 %), comparativ cu mediile nutritive GD și MS-1.

La inițierea culturilor din muguri se formează 1-3 lăstari de 0,5-1,5 cm după al treilea pasaj, care se pot recolta pentru un nou pasaj de multiplicare *in vitro* sau pentru înrădăcinare.

Concentrația și compoziția hormonilor de creștere au influențat semnificativ procesul de multiplicare a culturilor. Benzilaminopurina (0,8 mg/l), lizina (20 mg/l) și sulfatul de adenină (40 mg/l) au fost optime pentru multiplicare. Viabilitatea în condiții normale a variat în funcție de numărul pasajului (starea fiziologică a explantului) ajungând până la 100%. Clorura de sodiu în concentrație de 7g/l a diminuat la plopul alb viabilitatea la 4,5%.

Viabilitatea explantelor din variantele cu NaCl 20 g/l a fost nulă, dar în variantele cu CaCO<sub>3</sub> 100 g/l a fost de 60 % pentru plopul alb. Controlul de toleranță la clorura de sodiu s-a testat pentru concentrațiile de 6 și 12 g/l, iar la carbonatul de calciu s-a folosit concentrația de 100 g/l. Viabilitatea explantelor tolerante la NaCl a fost de 40 % și 13,3 % pentru concentrația de 6 și respectiv 12 g/l. La carbonatul de calciu viabilitatea s-a situat între 81,8 și 88,2 %.

Un prim experiment a urmărit capacitatea de rizogeneză a lăstarilor pe mediile de cultură MS-1 1/2 și WPM1/2 în condiții normale. Nu s-a observat o diminuare a capacității de rizogeneză a lăstarilor.

Un al doilea experiment de înrădăcinare *in vitro* a testat capacitatea de rizogeneză a lăstarilor în prezența diferitelor concentrații de NaCl. Rizogeneză se realizează până la 90% în prezența a 5g/l NaCl și se reduce la 8 procente la concentrația de 10 g/l. Clorura de sodiu în cantitate de 16 g/l determină oprirea procesului de rizogeneză și necrozarea inoculului.

Al treilea experiment de rizogeneză *in vitro* al explantelor de plop alb s-a realizat în prezența carbonatului de calciu în concentrație de 50 și, respectiv, 100 g/l. Lăstarii au format rădăcini în ambele concentrații ale carbonatului de calciu. O dată cu apariția rădăcinilor are loc și o creștere în lungime a lăstarilor.

Etapa de transfer *in vivo*. Microbutașii înrădăcinați la sfârșitul fazei de înrădăcinare *in vitro* au fost transferați *in vivo*, folosindu-se un substrat steril format din pământ fertil și turbă (1:1) în condiții climatizate. Au supraviețuit, după 25 de zile, 61 % din plantulele transferate.

#### **4.3.Culturi *in vitro* la plopul tremurător (*Populus tremula* L.)**

Explantulele de plop, care au răspuns satisfăcător la culturile *in vitro*, au fost în perioada repausului vegetativ mugurii fără solzi protectori, iar în perioada de vegetație segmentele nodale cu muguri axilari. Viabilitatea la segmentele nodale a fost mai bună la cele recoltate la sfârșitul repausului vegetativ, iar la cele recoltate în perioada de vegetație când mugurele s-a format complet. Mugurii excizați cu o mică parte de țesutul lemnos al segmentul nodal, au avut o viabilitate de până la 40 %, când au fost repasați

pe același mediu de cultură și balanță hormonală.

După primul pasaj de multiplicare, care a durat patru săptămâni, se observă o creștere în dimensiuni a frunzelor, iar baza explantului se hipertrofiază. Infecțiile endogene se manifestă și pe parcursul primului pasaj, fapt ce contribuie la diminuarea procentului de explante viabile cu 28 %. La sfârșitul pasajului al doilea se formează lăstari, care se alungesc până la 1,5 cm, cu mugure terminal și incipient muguri axilari la inserția frunzelor, în special la partea bazală a explantului. După al treilea pasaj de la inițiere se formează la plopul tremurător 1-3 lăstari de 0,5-1,5 cm, care se pot recolta pentru un nou pasaj de multiplicare sau pentru înrădăcinare *in vitro*.

În etapa de alungire-multiplicare, la plopul tremurător, pe mediile de cultură normale și experimentale, viabilitatea și reactivitatea explantelor a fost influențată de mediul de cultură, compoziția și concentrația balanței hormonale, prezența sau absența factorului abiotic, concentrația acestuia, durata și numărul pasajului. Astfel, în primul experiment viabilitatea s-a menținut ridicată 78,9-100 % pe mediul de cultură optim (BAP 0,2 mg/l, lizină și sulfat de adenină) în condiții normale. Caseina hidrolizată din mediul nutritiv a redus viabilitatea la 53,3 %. Pasajele succesive pe mediile de cultură cu BAP în concentrație mare a determinat stagnarea creșterii explantelor și acumularea de pigmenți la nivelul frunzelor.

În experimentul al doilea s-a testat capacitatea de regenerare în condiții normale după expunerea la diferite concentrații de NaCl și CaCO<sub>3</sub> (tabelul 1). O viabilitate optimă pentru selecție s-a realizat la concentrația NaCl 6 g/l și a CaCO<sub>3</sub> 100g/l.

Diferențierea de rădăcini s-a obținut pe mediul de cultură MS-1 1/2 sau WPM 1/2, care a inclus IBA 0,3-0,4 mg/l și NAA 0,1 mg/l.

Primul experiment de rizogeneză a avut în vedere testarea capacității de toleranță prin înrădăcinarea lăstarilor viabili din faza de multiplicare pe mediul de cultură cu concentrații diferite de clorură de sodiu și carbonat de calciu. Viabilitatea la înrădăcinare după expunerea la NaCl în concentrația de 12 g/l a fost de 5-12,5 %, dar a crescut la 30-33 % la concentrația de 6 g/l.

Carbonatul de calciu în concentrație de 100 g/l nu afectează puternic țesuturile explantului inoculat fapt ce a permis o înrădăcinare *in vitro* de 80-90 %.

Al doilea experiment de rizogeneză a avut în vedere testarea capacității de înrădăcinare a lăstarilor viabili din faza de multiplicare pe mediul de rizogeneză optim lipsit de clorură de sodiu și carbonat de calciu. Viabilitatea s-a menținut între 77,8 % și 95,0 %. Al treilea experiment s-a axat

**Tabelul 1.** Influența concentrației factorilor abiotici (NaCl sau CaCO<sub>3</sub>) asupra capacității de regenerare a explantelor de *P. tremula*

The influence of abiotic factors concentration (NaCl and CaCO<sub>3</sub>) on regeneration capacity of *P. tremula* explants

Concentrația factorului abioticdin mediul precedent	Viabilitatea explantelor (%)
NaCl 12 g/l	14,8
NaCl 8 g/l	31,2
NaCl 6 g/l	41,7
CaCO <sub>3</sub> 50 g/l	76,9
CaCO <sub>3</sub> 100g/l	66,7

pe regenerarea lăstarilor prin înrădăcinare normală după expunerea la concentrațiile de 50 și 100 g/l a  $\text{CaCO}_3$ . Viabilitatea a fost de 85,7% și 75,0%.

Etapa de transfer *in vivo*. Microbutașii înrădăcinați la sfârșitul fazei de înrădăcinare *in vitro*, au fost plantați în ghivece mici pe un substrat steril format din pământ fertil și (1:1) turbă în condiții climatizate. La 25 zile după aclimatizare au supraviețuit 70% din plantulele transferate *in vivo*.

## 5. CONCLUZII, RECOMANDĂRI ȘI MODALITĂȚI DE VALORIFICARE ȘI UTILIZARE A REZULTATELOR

În urma desfășurării lucrărilor s-a realizat inițierea de culturi *in vitro* la plop și salcâm, utilizând mai multe tipuri de explante și s-au stabilit metode de sterilizare eficiente pentru obținerea unui număr mare de explante viabile.

De asemenea, s-au stabilit mediile de cultură și balanțele hormonale care sunt eficiente pentru faza de inițiere (WPM pentru plop și MS-1 pentru salcâm cu BAP 0,4-1mg/l și în prezența unei auxine cu concentrație scăzută).

La salcâm, o rată de multiplicare optimă s-a obținut pe mediul de cultură MS-1, cu o balanță hormonală alcătuită din BAP 0,7 mg/l, IBA și NAA 0,05mg/l, în prezența caseinei hidrolizate 500 mg/l. La plopul tremurător mediul de cultură optim pentru multiplicare a fost WPM cu BAP 0,2 mg/l, IBA și NAA 0,05 mg/l, lizină 20 mg/l și sulfat de adenină 40 mg/l. La plopul alb o rată de multiplicare optimă s-a obținut pe mediul de cultură MS-1 sau WPM cu o balanță hormonală alcătuită din BAP 0,8 mg/l, IBA și NAA 0,05mg/l, în prezența lizinei 20 mg/l și sulfatului de adenină 40 mg/l.

Balanța hormonală se poate menține constantă pe parcursul a 2-3 pasaje de multiplicare la salcâm și plopul tremurător, comparativ cu plopul alb, unde este necesară o alternare a concentrației hormonilor de creștere.

Au fost determinate concentrațiile optime de clorură de sodiu și carbonat de calciu la care explantele se pot multiplica și înrădăcina pentru selecția *in vitro* la genotipurile de *Populus* și *Robinia*: concentrațiile de clorură de sodiu la care se pot multiplica *in vitro* genotipurile de salcâm și plopul testat sunt de 8 g/l și respectiv 6 g/l, iar pentru carbo-natul de calciu a fost de 100 g/l.

S-a testat și capacitatea de menținere a rezistenței genotipurilor de salcâm și plop selecționate la concentrații moderate de clorură de sodiu și carbonat de calciu în procesul de multiplicare și înrădăcinare *in vitro*: carbonatul de calciu este mai puțin limitativ pentru multiplicare la salcâm, comparativ cu clorura de sodiu, deoarece acesta contribuie la menținerea pH-ului la o valoare constantă pe o perioadă mai mare de timp. De asemenea, s-au creat premisele stabilirii secvențelor de multiplicare și selecție *in vitro* la unele genotipuri de salcâm, plopul tremurător și plopul alb rezistente la clorură de sodiu și carbonat de calciu.

Se recomandă introducerea tehnologiilor (protocoalelor) de micropropagare și selecție *in vitro* la salcâm, plopul tremurător și plopul alb în programele de ameliorare pen-

tru înmulțirea materialelor de reproducere cu valoare biologică ridicată. Rezultatele cercetărilor se vor valorifica prin folosirea tehnologiilor de selecție *in vitro* pentru selecția de biotipuri de salcâm, plop tremurător și plop alb rezistente la adversități și anume salinitate (NaCl) și carbonați (CaCO<sub>3</sub>), care vor fi folosite în pepinierele experimentale ale I.C.A.S.

#### BIBLIOGRAFIE

AHUJA, M. R., 1986. Perspectives in plant Biotechnology, Current Science, March 5, Vol. 55, 5: 217-224.  
BADEA, E. M., SĂNDULESCU, D., 2001. Biotehnologii vegetale, Fundația Biotech, București: 1-195.

#### ABSTRACT

RESEARCHES CONCERNING *IN VITRO* SELECTION OF SAME FOREST TREES GENOTYPES RESISTANT TO ABIOTIC STRESS

The researches focused on testing the initiation, multiplication and rooting *in vitro* phases at black locust (*Robinia pseudacacia* L.), white poplar (*Populus alba* L.) and aspen (*Populus tremula* L.) on different culture media and hormonal balances in order to determine the capacity of multiplication, rooting and resistance of the explants at different concentrations of NaCl and CaCO<sub>3</sub> for establishing the optimum culture condition, that can lead to an *in vitro* selection technology at this species.

For black locust, an optimum multiplication rate has been obtained on MS-1 culture medium supplemented with BAP 0,7 mg/l, IBA and NAA 0,05 mg/l and casein hydrolyzate 500 mg/l. For aspen we have used WPM medium supplemented with BAP 0,2 mg/l, IBA and NAA 0,05 mg/l, lysine 20 mg/l and adenine sulphate 40 mg/l. For white poplar an optimum multiplication rate has been obtained on MS-1 or WPM culture medium supplemented with BAP 0,8 mg/l, IBA and NAA 0,05 mg/l, lysine 20 mg/l and adenine sulphate 40 mg/l. The optimum concentration of NaCl and CaCO<sub>3</sub> for which the explants can multiply and form roots for *Populus* and *Robinia* are 8 g/l and respectively 6 g/l NaCl and 100 g/l for CaCO<sub>3</sub>. An *in vitro* selection strategy was established for some genotypes of black locust, white poplar and aspen resistant to NaCl and CaCO<sub>3</sub>.