APRECIEREA POTENȚIALULUI MORFOGENETIC ȘI REGENERATIV AL GENOTIPURILOR DE TRITICALE ÎN CULTURA *IN VITRO*

Ciobanu Renata

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Chișinău, Republica Moldova

e-mail: renata.ciobanu@igfpp.md

Abstract

Triticale is an important cereal crop grown throughout the world. Research showed that the regeneration of young plants from mature embryos triticales depended on genotypic characteristics. The frequency of callusogenesis varied depending on the genotype and was: 188 TR5027 - 80.19%, Ingen 93 standard - 92.02% and Ingen 35 - 98.45%, and the frequency of rhizogenesis compared to embryogenesis proved to be high and constituted on average 57.35%. Only in 34.53% of the morphogenic callus, the development was of the embryoid type. The average frequency of regeneration was 35.07%. The dispersive analysis of the obtained results shows a significant influence of the genotype in establishing a positive callusogenetic response ($P < 0.001$), the influence power being 76.04%.

Key words: triticales, calus, callusogenesis, morphogenesis, plant regeneration.

Introducere

Direcția principală de cercetare este dictată de necesitatea actuală și de viitor a țării în asigurarea securității alimentare [1]. Crizele climaterice, energetice și alimentare globale și regionale impun în fața societății științifice, îndeosebi a geneticii și fiziologiei plantelor, mari obiective de a obține noi cunoștințe fundamentale și aplicate în evidențierea, evaluarea și dirijarea mecanismelor genetico-fiziologice a procesului de producție și de rezistență ecologică a plantelor, în cazul de față a triticalelor, prin îmbunătățirea adaptabilității la condițiile climatice nefavorabile: creșterea rezistenței la stresul hidric și termic și obținerea de producții sănătoase [2].

În ultimele decenii, datorită progreselor genetice obținute în ameliorare au fost create soiuri mult mai competitive decât genotipurile actuale de cereale păioase. Aceste soiuri sunt mai bune datorită capacității ridicate de producție și a unor însușiri agronomice utile (rezistență la cădere, rezistență la condițiile nefavorabile de mediu, umplerea bobului, etc.).

Din punct de vedere tehnic triticalele au o mare capacitate de a se adapta la cele mai diferite condiții climatice, ceea ce îi conferă incontestabile avantaje față de alte culturi mai pretențioase la factorii naturali [3].

Importanța culturii de triticale pentru economie este explicată prin compoziția chimică a boabelor, care le conferă însușiri deosebite de utilizare în alimentație, în furajarea animalelor, precum și în industrie.

Metodele biotehnologice, prin aplicarea tehnicilor de cultură *in vitro* reprezintă o cale sigură pentru obținerea unui material biologic liber de agenți patogeni, conservarea resurselor genetice și calea cea mai rapidă pentru crearea și multiplicarea genotipurilor [4; 5; 9; 10; 12].

Având în vedere aceste aspecte ne-am propus stabilirea unor modalități de cultură care să asigure succesul regenerării *in vitro* a unor genotipuri valoroase din punct de vedere agronomic [6; 8; 11].

Materiale și metode

Materialul biologic utilizat în acest studiu a fost reprezentat de 3 genotipuri de triticale din: Ingen 35, Ingen 93, 188TR5027. În calitate de material inițial au servit embrionii maturi, care includ câte 120 de embrioni de la fiecare genotip. Embrionii maturi au fost aseptizați în soluție de hipoclorit de Na în concentrație de 7 % timp de 30 min., apoi au urmat 3-4 spălări repetate cu apă distilată sterilă. Embrionii au fost excizați de pe cariopsă sub lupa binoculară, sterilizați suplimentar și inoculați pe mediul de inițiere a calusului. Ca substrat nutritiv de bază a servit mediul Murashige și Skoog (1962) [7], modificat și suplimentat cu L-asparagină-150 mg/l, mezoinozitol-100mg/l, glicină-2mg/l, zaharoză-30 mg/l, agar- 7 g/l și reglatori de creștere: 2,4-D acid diclorofenoxiacetic, acid naphtylacetic (ANA) și kinetină (K), BAP (6-benzilaminopurine) în diverse concentrații și combinații. Valoarea pH-lui a fost ajustată înainte de

autoclavare până la 5,8. Mediile nutritive s-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori (10 min), apoi aerisire (20 min) și sterilizare în condițiile de presiune $P = 1 \text{ atm}$ și temperatura $T = 120^{\circ}\text{C}$. Cultivarea s-a efectuat utilizând boxa cu flux laminar de aer steril. Explantele au fost cultivate la $T = 25-27^{\circ}\text{C}$ la întuneric timp de două săptămâni, apoi transferate la lumină timp de 2-3 săptămâni.

Experiențele s-au efectuat după schema analizei dispersive bifactoriale; în analiza statistică s-a utilizat pachetul de programe STATGRAPHICS Plus 2.1. Pentru analiza variației și determinarea puterii de influență a genotipului și interacțiunii asupra parametrilor analizați s-a folosit testul ANOVA, iar pentru aprecierea diferențelor semnificative s-a aplicat testul Student.

Rezultate și discuții

În scopul cercetării proceselor de calusogeneză s-au inițiat culturi de calus din embrioni maturi la toate genotipurile studiate. Diferențierea intensă a explantelor și apariția formării calusului pe medii de cultură au fost observate în ziua a 4-a, ceea ce este în concordanță cu datele din literatură [13; 14]. Formarea masivă de calus a fost observată la a 7-8-a zi. S-a constatat că, toate genotipurile testate au o capacitate destul de mare de inducere a calusului. Frecvența calusogenezelor a variat de la 80,19 % (188 TR5027), 92,02 % (Ingen 93 standart) și 98,45 % (Ingen 35) în funcție de genotip (fig. 1).

Figura 1. Frecvența calusogenezelor la genotipurile de triticale.

S-a atestat formarea a 2 tipuri de calus. Primul tip de calus este embriogen - compact, structurat, de culoare gălbuie; al doilea - neembriogen, apos, de culoare alb - gălbuie.

În pofida faptului că există dovezi în literatură că, mai întâi, se formează un calus neembriogen, care fie rămâne calus primar în timpul cultivării, fie este transformat într-un tip embriogen [14], s-a observat că, calusul neembriogen, pe tot parcursul subcultivării explantelor, nu a format focare meristematice și nici nu a fost observată embriogeneza somatică.

Frecvența morfogenezei depinde de inducerea embriogenezei și rizogenezei. Genotipurile Ingen 35 și 188 TR5027 au format calus embriogen cu o rată de 34,22% – 40,15%. Un potențial morfogenetic scăzut atestă genotipul Ingen 93 - 29,24% (fig.2).

Figura 2. Frecvența morfogenezei calusului la genotipurile de triticale.

Evident, acest lucru se datorează particularităților morfogenezei, care se desfășoară pe calea organogenezei, cu o predominanță a tipului rizogen.

Frecvența rizogenezei comparativ cu embriogeneza s-a dovedit a fi înaltă și a constituit în medie 57,35%. Doar la 34,53% din calusul morfogen, dezvoltarea a fost de tip embrioid. Aceasta denotă că, realizarea morfogenezei este determinată de caracteristicile genetice și fiziologice ale explantului. Embrionii somatici care s-au format în calusul morfogen, în procesul de creștere și dezvoltare, au apărut pe suprafața calusului și au format regeneranți.

Regenerarea stabilă a plantelor este o condiție pentru utilizarea practică a culturii *in vitro*. Frecvența regenerării în medie a constituit 35,07%. Potențialul de regenerare a variat semnificativ în funcție de genotip. Dacă la genotipurile Ingen 35 (49,03%) și Ingen 93 (40,70 %), atunci pentru genotipul 188 TR5027 a constituit doar 15,50%, fiind o rată mică de regenerare (fig. 3).

Figura 3. Frecvența regenerării de plantule.

Numărul regeneranților obținuți din calus morfogen a fost de 0,2 și 1,3 buc. respectiv. Aceasta se datorează faptului că un număr mare de calusuri morfogene s-au dezvoltat pe calea rizogenezei, ceea ce exclude posibilitatea de a obține plante.

Analiza varianței a făcut posibilă identificarea factorilor semnificativi care influențează calusogeneza, morfogeneza și regenerarea. Frecvența calusogenezei, de regulă, depinde de un număr de factori aleatori. Un factor semnificativ pentru acest indicator este genotipul. Comparând contribuția diferiților factori și interacțiunea lor între ei, trebuie remarcat faptul că genotipul joacă un rol semnificativ nu numai în procesul de calusogeneză, constituind 76,04%, dar determină și capacitatea de regenerare, manifestând o putere de influență de 69,15% cu diferențe semnificative pentru $P \leq 0,05$.

Concluzii

1. Cercetările efectuate au demonstrat că inițierea calusogenezei și regenerării de plantule din embrioni maturi la triticales depinde de caracteristicile genotipice.
2. Frecvența calusogenezei a variat în dependență de genotip și a constituit: 188 TR5027 -80,19%, Ingen 93 standart - 92,02% și Ingen 35 - 98,45%, iar frecvența rizogenezei comparativ cu embriogeneza s-a dovedit a fi înaltă și a constituit în medie 57,35 %. Doar la 34,53% din calusul morfogen, dezvoltarea a fost de tip embrioid. Frecvența regenerării în medie a constituit 35,07%.
3. Analiza dispersională a rezultatelor obținute, denotă o influență semnificativă a genotipului în stabilirea unui răspuns pozitiv calusogenetic ($P \leq 0,001$), puterea de influență constituind 76,04%.

Cercetările au fost realizate în cadrul proiectului Programului de Stat 20.80009.5107.03 “Valorificarea eficientă a resurselor genetice vegetale și biotehnologiilor avansate în scopul sporirii adaptabilității plantelor de cultură și schimbările climatice”, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Bibliografie

- 1.COTIANU, R.D., 2005 - Politici și strategii globale de securitate alimentară. ASA București: 100-115.
- 2.TUDOSE-SINESCU, V. Cercetări ecologice asupra culturilor de triticosecale înființate pe solurile podzolice de la albota – argeș, 2010, Teză de doctorat.
3. POJMAJ, M.S., POSMAJ, R., 2006 - Breeding triticales for sprouting resistance and baking quality. Proc. of. 6 th Intr. Sym. Stellenbosch, Sout Africa, 3-7 sept, 60.
- 4.MORARU, I., RĂDUCANU, F., 1990 – INCDA Fundulea, Realizări în domeniul biotehnologiei vegetale, Analele INCDA, vol. LXXV, p. 88-93 106.
- 5.HUSSAIN, M., KHAN, G.S., SHAHEEN, M.S., AHMAD, M. (2001). Somaclonal variation in regenerated plants of ten wheat genotypes. J. Agric. Res. 39, 1, 1–7.
- 6.CHEN J., YUE R., XU H., CHEN X. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm supported culture // Agric. Sci. China. – 2006. – V. 5, № 8. – P. 572-578.
- 7.MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-479.
- 8.КОЗЫРЕВА О.Г., ДУНАЕВА С.Е. Генетика регенерации в культуре *in vitro* злаков // Генетика, 1994, том 30, 10, с.1432-1440.
- 9.КАТАСОНОВА, А.А. Оптимизация технологии получения растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы в каллусной культуре *in vitro*: Автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук. - Уфа: Ин-т биол. УНЦ РАН. 2007.
- 10.КРУГЛОВА, Н.Н., КАТАСОНОВА, А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный эксплант // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 2. – P. 124-131.
- 11.ПЫКАЛО, С.В., ЗИНЧЕНКО, М.А., ВОЛОЩУК, С.И., ДУБРОВНАЯ, О.В. Морфогенез тритикале озимого в культуре апикальных меристем побегов // Сб. матер. I Междунар. научн.-практ. конф. «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Пинск, 25-26 сентября 2014 г. – Пинск, 2014. – С. 29-34. Сатарова.
- 12.НИКИТИНА, Е.Д., ХЛЕБОВА, Л.П., ПРОНИНА, Р.Д. (2015). Соматоклональная изменчивость *in vitro* как источник создания исходного материала для селекции мягкой пшеницы. Acta Biologica Sibirica, 1 (3-4), 171-186.
- 13.ТАНАСИЕНКО, И.В., ЕМЕЦ, А.И., БЛЮМ, Я.Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории // Цитология и генетика, 2009. – № 4. – С. 12-19.
- 14.ЗАУШИНЦЕНА, А. В., БЕРЕЗИН, В. Ю. Оценка эффективности образования каллуса у тимopheевки луговой на селективных средах // Вестник Кемеровского государственного университета, 2015. – № 1 (61). – Т. 4. – С. 7- 10.