



## REZUMAT

### Cuvinte cheie: cânepa, microsporogeneză, androgeneză

Cânepa (*Cannabis sativa* L.) este o plantă a cărei importanță economică este în creștere, datorită utilizărilor variate în alimentație, industria textilă, a maselor plastice, construcții și medicină.

Îmbunătățirea caracterelor cultivarelor de cânepă poate fi ușurată prin biotehnologiile vegetale moderne, dintre acestea, utilizarea androgenezei experimentale pentru producerea liniilor dublu haploide fiind importantă atât pentru ameliorarea speciei cât și pentru studii genetice viitoare.

**Teza de doctorat cu titlul „Particularitățile microsporogenezei și inducerea androgenezei experimentale la cânepă (*Cannabis sativa* L.)”** este structurată în două părți și cuprinde opt capitole.

Prima parte prezintă studiul bibliografic și cuprinde descrierea speciei *Cannabis sativa* L., date generale privind microsporogeneza și inducerea androgenezei.

A doua parte cuprinde o prezentare a cadrului instituțional în care au fost desfășurate experiențele, obiectivele, materialul și metoda de cercetare și rezultatele proprii.

**Capitolul I – Descrierea speciei *Cannabis sativa* L.** prezintă istoricul și utilizările cânepii, morfologia, sistematica și filogenia precum și o sinteză a studiilor de genetică și ameliorare întreprinse la această specie.

**Capitolul II – Cercetări privind microsporogeneza la *Cannabis sativa* L.** prezintă aspecte generale și particulare referitor la formarea gameților masculi și defectele naturale ale microsporogenezei la cânepă.

**Capitolul III – Cercetări privind inducerea androgenezei la *Cannabis sativa* L.** cuprinde aspecte generale referitoare la metodele pentru inducerea androgenezei experimentale, factorii care influențează androgeneza la plante precum și studii anterioare asupra inducerii androgenezei la cânepă.



UNIONA FUNDPANA



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECTORII SOCIALE ȘI  
PERSONELOR VÂRSTNICE  
APROTECTORII



Fondul Social European  
PERIOADA 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
DEPOSDRE



USAMV Iași

## Capitolul IV – Obiectivele, materialul și metoda de cercetare

În scopul identificării condițiilor optime de cultură *in vitro* necesare pentru manifestarea

potențialului androgenetic al cultivarelor autohtone de cânepă, au fost stabilite următoarele obiective secundare:

- Stabilirea unor criterii indirecte pentru determinarea stadiului de dezvoltare a microsporilor.
- Stabilirea cultivarelor de cânepă cu potențial androgenetic ridicat;
- Stabilirea cultivarelor de cânepă cu potențial regenerativ/embriogenic ridicat
- Stabilirea combinației fitohormonale optime pentru inducerea androgenezei
- Stabilirea combinației fitohormonale optime pentru inducerea embriogenezei / caulogenezei la cânepă.

Materialul biologic folosit a fost alcătuit din cinci cultivare de cânepă. Trei cultivare, monoice, au provenit de la SCDA Secuieni și două cultivare, dioice, au provenit de la SCDA Lovrin.

Mugurii florali masculi au fost recoltați în diferite stadii de dezvoltare (aparitia mugurilor florali, începutul înfloritului și înflorit deplin), măsurați și grupați în patru categorii de dimensiune. După fixare, câte o anteră din fiecare mugure floral a fost analizată. Toate fazele meiotice au fost studiate și asociate cu dimensiunea mugurilor florali masculi, în vederea stabilirii unor criterii indirecte pentru determinarea stadiului de dezvoltare a microsporilor.

Mugurii florali care au conținut microspori în stadiul optim de dezvoltare pentru inducerea androgenezei au fost recoltați dimineața și sterilizați, anterele fiind prelevate aseptice și inoculate în pahare de tip Erlenmeyer (100 ml) conținând câte 20 ml de mediu de cultură, suplimentat cu diferite combinații fitohormonale.

Anterele inoculate au fost incubate la întuneric, la temperatura de 28°C timp de 3 săptămâni iar apoi au fost transferate în camera climatică la o temperatură de 25°C, și fotoperioadă 16 ore lumină / 8 ore întuneric. A fost observată inducerea calusului, proliferarea calusului, culoarea anterelor în timpul incubării, culoarea calusului indus în perioada de incubare, culoarea calusului transferat la lumină și tipul de calus pentru a stabili cultivarele de cânepă cu potențial androgenetic ridicat și combinațiile fitohormonale optime pentru inducerea androgenezei.



UNIONE EUROPEA



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECTORILOR SOCIALE ȘI  
PERSONELOR VÂRSTNICE  
APROPRIATE



Fondul Social European  
PERIOADA 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
DEPOZIT



USAMV Iași

Calusul indus în cultura de antere a fost secționat în piese de dimensiuni egale și transferat pe mediile de inducere a organogenezei / embriogenezei în vase de tip Erlenmeyer (100 ml) conținând câte 20 ml de mediu de cultură suplimentat cu diferite combinații fitohormonale. Calusul a fost menținut în camera climatică, la o temperatură de 25°C, și fotoperioadă 16 ore lumină / 8 ore întuneric.

Inducerea organogenezei / embriogenezei a fost apreciată în funcție de procentul calusului care a prezentat necroză, rizogeneză sau embriogeneză. Asupra calusului transferat au fost efectuate și analize morfogenetice (culoarea calusului și tipul acestuia).

### **Capitolul V – Asocieri între stadiul de dezvoltare a microsporilor și dimensiunea mugurilor floralii la *Cannabis sativa* L.**

Dimensiunea mugurilor floralii masculi poate fi considerată un criteriu indirect pentru determinarea stadiului de dezvoltare a microsporilor, dar acest criteriu trebuie verificat pentru fiecare cultivar de *Cannabis sativa* L. în parte, la inițierea culturii de antere, pentru că anterele nu conțin neapărat microspori în același stadiu de dezvoltare, pentru mugurii floralii de aceeași dimensiune, de la cultivare diferite.

În general, microspori în stadiul uninucleat au fost identificați în anterele mugurilor floralii mascului cu dimensiuni cuprinse între 4,1 și 6 cm.

### **Capitolul VI – Inducerea androgenezei în cultura de antere la *Cannabis sativa* L.**

Cultivarele Silvana și Denise au fost caracterizate de cele mai ridicate frecvențe de inducere a calusului, în timp ce cultivarul Diana a avut cea mai redusă capacitate de inducere a calusului pe diferitele concentrații fitohormonale analizate.

Proliferarea calusului este diferită, în funcție de cultivarul analizat. Cea mai bună proliferare a fost observată în cazul cultivarului Denise, urmat de cultivarul Silvana, iar pentru Diana a fost observată cea mai slabă proliferare a structurilor androgenetice induse în cultura de antere.

A fost observată o legătură reală între procentul anterelor care au generat calus și proliferarea acestuia. Totuși există și cazuri în care un cultivar caracterizat de frecvențe mai mici de inducere a calusului a avut proliferări maxime în cadrul experienței.

În general, o bună inducere și proliferare a calusului a fost observată pe mediul de cultură MS suplimentat cu 1 mg/l 2,4D + 2 mg/l KIN. Rezultate bune au fost observate și pe mediul de cultură MS suplimentat cu 2 mg/l AIA + 1 mg/l KIN. Concentrații mai ridicate de 2,4D sau mai scăzute de AIA au avut ca efect inhibarea inducerii și proliferării ulterioare a structurilor androgenetice.



## **Capitolul VII – Inducerea organogenezei / embriogenezei din calusul indus în cultura de antere la specia *Cannabis sativa* L.**

Cultivarul Zenit nu a prezentat calus necrozat pe nici una dintre combinațiile fitohormonale cu care s-a suplimentat mediul de cultură MS, cel mai afectat de necroză fiind cultivarul Lovrin 110, mai ales pe mediile de cultură suplimentate cu 0,5 mg/l AIA + 1 mg/l BAP. De altfel, utilizarea BAP în concentrații mici ca sursă de citochinine, în combinație cu 0,5 mg/l AIA determină apariția fenomenului de necroză a calusului cu frecvențe ridicate, pentru majoritatea cultivarelor studiate, excepție făcând cultivarul Zenit;

Rizogeneza a fost observată pentru toate cele patru cultivare luate în studiu, cultivarul Lovrin 110 fiind mai predispus la acest fenomen față de restul cultivarelor. Utilizarea KIN ca sursă de citochinine, pe o balanță fitohormonală în favoarea citochininelor, favorizează rizogeneza, frecvența cu care apare acest fenomen fiind mai ridicată pentru concentrații mai ridicate de KIN. Aceeași tendință de creștere a frecvenței calusului care prezintă rizogeneză o dată cu creșterea concentrației de citochinine a fost observată și când am utilizat BAP ca sursă de citochinine.

Cultivarul are un efect semnificativ asupra prezenței calusului embriogenic. În condițiile noastre experimentale, calusul indus de cultivarul Zenit a fost caracterizat de prezența fenomenului de embriogeneză cu frecvențe ridicate, pe când pentru cultivarul Denise nu a fost observat acest fenomen, cu toate că, în privința inducerii calusului, anterele acestui cultivar au răspuns cu frecvențele medii cele mai ridicate. Citochininele cu care au fost suplimentate mediile de cultură au influențat apariția calusului cu structuri proembrionare. Un efect stimulator din acest punct de vedere l-a avut prezența BAP în concentrație de 2 mg/l și utilizarea a 1 mg/l KIN + 1 mg/l BAP ca sursă de citochinine;

Caulogeneza nu a fost observată pentru nici un cultivar sau combinație fitohormonală testată.

## **Capitolul VIII – Reacția morfogenetică a anterelor cultivate „*in vitro*”.**

În timpul perioadei de incubare, anterele au prezentat o gamă variată de culori. Anterele de culoare maro închis, nu au generat calus și au murit sau calusul indus inițial nu a proliferat.

Structurile androgenetice s-au format în cadrul anterelor de culoare verde, verde gălbui, verde gălbui cu pete maro sau maro gălbui, anterele modificându-și ulterior culoarea în maro închis.



UNIONUL EUROPEAN



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECTORATUL SOCIAL ȘI  
PERSOANELOR VÂRSTNICIE  
AVANSATE



Fondul Social European  
PERIOADA 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
DEPOSDRE



USAMV Iași

După aproximativ 14 zile de la inocularea anterelor pe mediile de inducere, au început să apară primele structuri androgenetice, diferite în ceea ce privește frecvența, culoarea și tipul, în funcție de cultivar și combinațiile fitohormonale utilizate. Au fost constatate diferențe în ceea ce privește reacția anterelor chiar și în interiorul aceleiași vas de cultură.

În timpul perioadei de incubare, calusul a avut, în general, culoarea crem fiind de tip compact, ocazional de culoare albă.

După transferul la lumină, calusul provenit din antere are o evoluție diferită, în funcție de variantele fitohormonale și cultivar. În general, calusul își păstrează structura compactă, chiar dacă există o diferență de culoare sau de proliferare.

După transferul pe mediile de diferențiere/regenerare, o parte din calusul compact devine friabil, granular. Proliferarea a fost observată pentru majoritatea structurilor transferate. Sub influența a 0,5 mg/l AIA și diferitelor surse de citochinine utilizate, culoarea calusului rămâne, crem, verde sau maro, sau își schimbă culoarea, fiind observate suprafețe de calus caracterizate de diferite culori în cadrul aceleiași structuri calusale.

Calusul verde a fost caracterizat de prezența centrilor meristematici. O parte din structurile transferate devin friabile, cu aspect granular sau nu, existând și cazuri în care același calus a prezentat zone de tipuri diferite, calusul embriogenic fiind observat pentru zonele de calus care au devenit friabile, și de culoare verde, în diferite nuanțe. Atunci când fenomenul rizogenezei a fost observat, acesta a fost mai intens atunci când calusul a avut culoarea crem sau maro, și mai puțin intens pe calusul de culoare verde, în diferite nuanțe.

În cazul în care transferul calusului a fost efectuat astfel încât rădăcinile să fie în contact cu mediul de cultură, acestea au cunoscut o dezvoltare rapidă, mai ales în cazul suplimentării cu KIN ca sursă de citochinine.

Nu a fost observat fenomenul caulogenezei pentru nici un cultivar sau combinație fitohormonală testată.