

REZUMAT

Cuvinte cheie: hibridări apiren x apiren și piren x apiren; germinare *in vitro*; regenerare *in vitro*; aclimatizare *ex vitro*

Teza de doctorat cu tema „ *Cercetări privind utilizarea embrioculturii in vitro pentru crearea soiurilor apirene la vița de vie*”, reprezintă un nou început privind aplicarea unor metode biotehnologice moderne în crearea de noi soiuri fără semințe de viță de vie cu diverse direcții de utilizare și rezistență crescută la condițiile nefavorabile de mediu.

Experiențele au fost realizate în cadrul experimental al Stațiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Bujoru și Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Valea Călugărească, în perioada anilor 2009-2012.

Teza însumează un număr de 178 pagini și este structurată în două părți și cuprinde cinci capitole:

Prima parte prezintă studiul bibliografic și cuprinde aspecte generale privind metodele utilizate în ameliorarea soiurilor apirene de viță de vie.

Partea a doua cuprinde o prezentare a cadrului natural și instituțional în care s-au desfășurat cercetările, materialul, metoda de cercetare și rezultatele proprii.

Capitolul I—Considerații generale privind utilizarea embrioculturii in vitro în procesul de creare a soiurilor apirene la vița de vie (*Vitis vinifera* L.) cuprinde o amplă documentare referitoare la istoricul, importanța și modul de obținere a soiurilor apirene de viță de vie.

Problematica utilizării embrioculturii *in vitro* în procesul de creare a soiurilor apirene este structurată în 4 subcapitole, în care se explică mecanismul genetic de formare a soiurilor apirene, metodele de ameliorare utilizate în crearea soiurilor apirene de viță de vie. Mari avantaje vizând întreaga gamă de utilizare a strugurilor prezintă soiurile apirene, care, pe lângă faptul că se utilizează tradițional la producerea stafidelor, se consumă în stare proaspătă, sunt mai igienice. Pe baza acestor considerente, în prezent se impune îmbunătățirea însușirilor de rezistență la factorii de stres a soiurilor apirene de viță de vie, pentru sporirea producției și consumului de struguri în stare proaspătă, dată fiind preferința crescândă de struguri fără semințe.

În subcapitolul 1.2 se definește mecanismul genetic de formare a soiurilor apirene. Cunoașterea modului de formare a soiurilor apirene de viță de vie atât sub aspectul cauzelor care le determină, cât și sub aspectul efectului transmiterii lor în descendență are un rol important în procesul de ameliorare a soiurilor apirene existente, precum și în procesul de creare de noi soiuri apirene prin hibridare și selecție continuă.

Subcapitolul 1.3 prezintă metodele de obținere a soiurilor apirene de viță de vie. Metodele convenționale utilizate în ameliorarea genetică a soiurilor apirene de viță de vie au la bază hibridarea între soiurile pirene, utilizate ca genitori femeli și soiurile apirene utilizate ca polenizatori (genitori masculi). Utilizarea metodelor convenționale de ameliorare bazate pe hibridări dintre genotipuri pirene x apirene în condiții *ex vitro* conduce la apariția unei largi diversități de hibrizi în F1 și un procent redus de indivizi care să prezinte caracteristicile dorite, iar prin aplicarea selecției descendenților obținuți rezultă un procent scăzut de plante apirene.

De asemenea și poliploidia joacă un rol important în evoluția viței de vie. Poliploidia indusă prezintă perspective deosebite la speciile horticole ce se înmulțesc vegetativ la care nu se pune problema fertilității scăzute sau chiar lipsa de fertilitate a unor tipuri de poliploizi. La aceste specii sterilitatea unor poliploizi se poate dovedi avantajoasă deoarece duce la formarea de fructe fără semințe sporindu-se astfel calitatea producției. O altă metodă de ameliorare genetică a viței de vie care a fost prezentată este mutageneza indusă cu agenți mutageni fizici și chimici, metodă relativ recentă în comparație cu cele tradiționale utilizate: hibridarea și izolarea mutațiilor somatice spontane.

Ultimul subcapitol este dedicat metodelor neconvenționale utilizate în crearea soiurilor apirene la viță de vie, care face obiectul prezentei teme de cercetare. Prin utilizarea embrioculturii ca tehnică de salvare a embrionilor și dezvoltarea lor în plante reprezintă o metodă eficientă de ameliorare a genotipurilor apirene. Eficacitatea tehnicii de transferare *in vitro* a embrionilor imaturi a crescut foarte mult prin utilizarea markerilor moleculari în identificarea și selecția celor mai bune genotipuri în procesul de hibridare. În prezent, în scopul contracarării dezavantajelor legate de ameliorarea soiurilor apirene prin metode convenționale cercetările sunt axate pe descifrarea determinismului genetic prin dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară al caracterului de apirenitate. În acest sens markerii moleculari pot fi utilizați pentru a identifica genele care controlează caracterul de apirenitate și în acest mod se accelerează procesul de introducere a genelor de apirenitate într-un genotip valoros.

Capitolul II- Stadiul actual al cercetărilor privind embriocultura la vița de vie este structurat în două subcapitole unde sunt prezentate principalele metode de ameliorare a soiurilor apirene la vița de vie cu referiri accentuate pe problematica procesului de transferare a embrionilor *in vitro* și a factorilor implicați în procesul de obținere a plantelor hibride.

Capitolul III este destinat descrierii cadrului instituțional unde s-au desfășurat cercetările, scopul și obiectivele prezentei teze de doctorat. Acest capitol cuprinde informații cu privire la structura laboratorului și a colecțiilor ampelografice a stațiunii SCDVV Bujoru și ICDVV Valea Călugărească.

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat au avut ca scop obținerea de descendenți sexuați, folosind ca genitori soiuri pirene și apirene, asigurându-se prin cultura *in vitro* dezvoltarea completă a embrionilor.

Pentru îndeplinirea scopului cercetărilor, s-au urmărit o serie de obiective:

- studierea posibilităților realizării embrioculturii în urma hibridării intraspecifice dintre soiuri apiren x apiren și pirene x apiren;
- stabilirea condițiilor optime care determină salvarea și dezvoltarea embrionilor zigotici imaturi în condiții *in vitro* (perioada de inoculare, compoziția mediilor de cultură, natura substanțelor stimulatoare de creștere);
- verificarea eficienței metodei embrioculturii *in vitro* comparativ cu metoda convențională de obținere a soiurilor în condiții *ex vitro*.

Tot în cadrul acestui capitol sunt prezentate genotipurile care au participat în procesul de hibridare (Apiren alb, Ceauș roz, Ceauș alb, Kiș miș negru) și informațiile referitoare la tehnicile și metode de lucru în laborator. Astfel sunt descrise protocoalele de lucru folosite în realizarea embrioculturii *in vitro* cu privire la salvarea embrionilor imaturi, germinarea, regenerarea, înrădăcinarea și aclimatizarea plantulelor hibride, precum și obținerea în condiții *ex vitro* a puieților hibrizi.

Ultima parte a acestui capitol prezintă metodele statistice folosite pentru prelucrarea rezultatelor experimentale. Se fac precizări referitoare la semnificația *diferențelor limită*,

coeficienților *de corelație* și *de regresie* și *metoda grafică* cu ajutorul cărora s-au interpretat rezultatele experimentale.

Capitolul IV – Rezultatele cercetărilor privind utilizarea embrioculturii *in vitro* în procesul de creare a soiurilor apirene la vița de vie, prezintă rezultatele obținute în urma activității de cercetare realizată pe durata studiilor doctorale. Acesta este structurat în cinci subcapitole și prezintă rezultatele obținute pentru cultura *in vitro* și *ex vitro*.

Prin cultura *in vitro* a fost posibilă salvarea embrionilor imaturi obținuți de la cele patru combinații hibride apiren x apiren și piren x apiren la diferite date postanteză având ca rezultat creșterea embrionilor și regenerarea și aclimatizarea plănuțelor hibride.

În urma realizării încrucișărilor dintre apiren x apiren (Apiren alb x Kiș miș negru) și piren x apiren (Ceaș alb x Kiș miș negru; Ceaș roz x Kiș miș negru și Coarnă neagră x Kiș miș negru) s-au obținut un număr diferențiat de embrioni pe fiecare combinație hibridă realizată. Boabele au fost recoltate la trei date postanteză 52-69-86 zile. În condiții de asepsie totală s-au excizat și inoculat embrionii pe mediul de cultură de bază Murashige & Skoog în condiții controlate de mediu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ și umiditate 85-95% timp de 13 săptămâni, perioadă necesară salvării embrionilor imaturi.

Numărul embrionilor obținuți a diferențiat în funcție de combinația hibridă și de momentul recoltării boabelor. Astfel, la combinația hibridă Apiren alb x Kiș miș negru, cel mai ridicat procent de embrioni s-a realizat la 69 zile după polenizare 34,3%, iar la o diferență nesemnificativă s-a situat embrionii obținuți la 52 zile după polenizare (33,5%). S-a evidențiat faptul că la 86 de zile de la polenizare, în cazul combinației hibride dintre apiren x apiren s-a instalat fenomenul de avortare a embrionilor cu o diferență față de cele două date postanteză anterioare de 1,3-2,1%. În cazul încrucișărilor dintre piren x apiren procentul de embrioni este diferit de la o perioadă la alta, evidențiindu-se faptul că în medie cei mai mulți embrioni s-au obținut la 86 zile după polenizare cu un procent de 34,03%. Creșteri semnificative ale procentului de salvare a embrionilor imaturi proveniți de la încrucișările apiren x apiren la 52-69 de zile postanteză au fost înregistrate pe mediul de cultură M&S (1962) adăugat cu 2,0 mg/l acid indolil butiric, 0,5 mg/l acid indolil acetic și 2,0 mg/l benzilaminopurină.

Embrionii care s-au dezvoltat normal au fost trecuți pe mediul de cultură Emershad & Ramming (1994).

Asupra germinării embrionilor s-au făcut observații după 14 săptămâni de la inoculare. Embrionii negerminați au fost transferați pe mediu de cultură proaspăt Murashig & Skoog (1962) adăugat cu 2 mg /l benzilaminopurină (BAP) pentru a-și continua dezvoltarea.

Dezvoltarea embrionilor pe mediul de cultură artificial prin germinarea acestora s-a realizat în proporție de 47,33 % în funcție de combinația hibridă și metodologia de cultură utilizată. Germinarea *in vitro* a embrionilor zigotici obținuți din încrucișările apiren x apiren și piren x apiren a fost influențată semnificativ pe mediul de bază Emershad și Ramming (1994), adăugat cu 1,0 mg/l acid giberelic și 1,0 mg/ acid indolil acetic.

Rezultatele cercetărilor cu privire la exprimarea capacității de regenerare a explantelor la cele patru combinații hibride, au arătat că diferențierea și creșterea nu este posibilă decât în prezența unui mediu de cultură specific caracterizat prin concentrații ale citochininei ce determină stimularea proceselor de organogeneză. Numărul de lăstari regenerați prin organogeneză directă simplă a fost cuprins între 40 și 59 de lăstari în funcție de combinația hibridă. Cel mai mare număr de lăstari s-a obținut în cazul combinației Ceauș roz x Kiș miș negru urmat de Ceauș alb x Kiș miș negru. Din punct al ratei de regenerare se evidențiază combinația hibridă Ceauș alb x Kiș miș negru cu un procent de regenerare de 73%, iar la polul opus se evidențiază combinația Apiren alb x Kiș miș negru cu un procent de 57,14% lăstari regenerați prin organogeneză directă.

Calusul regenerativ la 4 luni rezultat din germinarea embrionilor zigotici imaturi a fost cuprins între 35,7 % și 44,8%. Din punct de vedere al numărului de lăstari regenerați prin intermediul calusului, s-a obținut între 6,18 și 8,21 de lăstari /calus regenerativ. Cele mai semnificative rezultate s-au obținut la combinația hibridă Coarnă neagră x Kiș miș negru, cu cel mai ridicat număr de lăstari regenerați / calus regenerativ. În ceea ce privește regenerarea din germinarea directă multiplă (poliembrioni), rezultate semnificative s-a înregistrat la combinația apiren x apiren (Apiren alb x Kiș miș negru) respectiv 18,9%. Celelalte combinații hibride au avut o rată de regenerare din poliembrioni cuprinsă între 1,04 și 7,73%.

Cercetările noastre au evidențiat că, procesul de elongație în condiții *in vitro* a lăstarilor în funcție de tipul de explant, a relevat superioritatea capacității de creștere a lăstarilor proveniți prin organogeneză directă și cei proveniți din poliembrioni.

În procesul de regenerare *in vitro* un rol important îl au și regulatorii de creștere. Cercetările noastre au evidențiat o stimulare semnificativă în ceea ce privește capacitatea de

regenerare la o concentrație de 1,5 mg/l BAP , exercitând o acțiune stimulatorie a proceselor de elongație a lăstarilor.

Pentru inducerea înrădăcinării lăstarilor s-a utilizat mediul de bază Murashig Schoog cu balanțe hormonale diferite ale auxinelor AIA și ANA. Rolul celor două auxine a avut o influență diferită asupra capacității de înrădăcinare. În cazul combinației hibride Apiren alb x Kiș miș negru, pe mediul de cultura adăugat cu acid indolil acetic 1 mg/l a favorizat o capacitate de înrădăcinare de 71,22% comparativ cu influența acidului naftilacetic 1 mg/l care a favorizat o capacitate de înrădăcinare a lăstarilor regenerați de doar 65,11%. În cazul combinației hibride Ceauș roz x Kiș miș negru influența auxinelor a fost inversă, în sensul că acidul indolil acetic a favorizat o capacitate de înrădăcinare de 72,11 %, iar acidul naftil acetic a favorizat înrădăcinarea lăstarilor doar 65,67%.

Rezultatele cercetărilor efectuate în etapa de aclimatizare, au evidențiat importanța acestei faze, în vederea obținerii descendenților prin metoda culturii a embrionilor zigotici imaturi *in vitro*. Analiza comparativă a rezultatelor la aclimatizarea descendenților hibride provenite de la cele patru combinații, evidențiază faptul că aceștia au avut o toleranță diferențiată față de factorii de stres. Astfel, se evidențiază faptul că procentul cel mai ridicat privind clasa de aclimatizare se încadrează între 40-70%, diferențiat pe fiecare combinație hibridă. Se remarcă diferențe semnificative între clasele de aclimatizare.

Rezultatele obținute la aclimatizare evidențiază că cele mai slabe rezultate în ceea ce privește rezistența factorilor de stres se încadrează combinația hibridă Apiren alb x Kiș miș negru. Analizând variabilitatea fenotipică a plantelor obținute din cultura *in vitro* a embrionilor imaturi, la toate genotipurile analizate s-a înregistrat un comportament de tip intermediar (adult, dar și juvenil). Cea mai mare parte a plantelor analizate au prezentat, caracteristici asemănătoare plantelor de viță de vie obținute din semințe: dispoziția frunzelor după o filotaxie spiralată și absența cârceilor.

Ca metodă de creare a soiurilor de viță de vie s-a folosit în experiența noastră și metoda convențională. Pentru obținerea descenților hibridi s-a folosit semințe ajunse la maturitate de la trei combinații hibride dintre piren x apiren. Între formele apiren x apiren, nu se poate utiliza această metodă de ameliorare datorită întreruperii în evoluție a dezvoltării embrionului deci nu se formează decât rudimente de semințe.

Analizând datele referitoare la capacitatea de germinare în condiții *in vitro* și *ex vitro* s-a realizat diferențiat de modul de inducere a acestora. În condiții *in vitro* s-a obținut o germinare a embrionilor în medie de 50,01% comparativ cu germinarea embrionilor proveniți din semințe mature semănate în substrat nutritiv, unde s-a obținut o germinare medie de 24,67%. În ceea ce privește aclimatizarea plantelor în condiții de seră s-a constatat că nu sunt diferențe semnificative între cele două moduri de obținere a plantelor hibride respectiv *in vitro* și *ex vitro*.

În finalul tezei de doctorat sunt prezentate **concluziile generale și referințele bibliografice studiate.**