MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR
Al UNIVERSITĂȚII DE STAT DIN MOLDOVA

Cu titlu de manuscris:
C.Z.U: [633.11:631.528.632]:631.52(043.2)

CIOBANU Renata

VARIABILITATEA SOMACLONALĂ ȘI INDUSĂ DE RADIAȚIE LA TRITICALE *IN VITRO*

SPECIALITATEA: 162.01-GENETICĂ VEGETALĂ

TEZĂ de doctor în științe biologice

Conducător ştiinţific: **ANDRONIC Larisa,** doctor habilitat în științe biologice

Autor: **CIOBANU Renata**

Chişinău, 2023

Ciobanu Renata, 2023

CUPRINS

ADNOTĂRI (*română, engleză, rusă*) 5
LISTA TABELELOR 8
LISTA FIGURILOR 10
LISTA ABREVIERILOR 12
INTRODUCERE 13

1. CONCEPTE GENETICE DE SPORIRE A VARIABILITĂȚII GENETICE LA PLANTELE DE CULTURĂ 19
1.1. Rolul și importanța variabilității genetice la plantele de cultură 19
1.2. Triticale – aspecte genetice și ameliorative 25
1.3. Fenomenul inducerii *in vitro* a variabilității genetice la plante 33
1.4. Mecanisme de inducere a variabilității *in vitro* la plante 40
Concluzii la Capitolul 1 48

2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ŞI METODE DE CERCETARE 50
2.1. Materialul și metodologia cercetării 50
2.2. Metoda culturii *in vitro* 51
2.3. Metoda mutagenezei fizice 54
2.4. Metoda citologică de studiere a mitozei 55
2.5. Analiza polimorfismului genetic prin tehnica RAPD 55
2.6. Evaluarea caracterelor cantitative 57
2.7. Analiza statistică a datelor experimentale 58
Concluzii la Capitolul 2 59

3. APRECIEREA POTENȚIALULUI MORFOGENETIC ŞI REGENERATIV AL GENOTIPURILOR DE TRITICALE ÎN CULTURA *IN VITRO* 60
3.1. Iniţierea calusogenezei şi regenerării de plantule din embrioni maturi de triticale 60
3.1.1. Optimizarea mediilor de cultură pentru inducerea calusogenezei 60
3.1.2. Interacţiunea factorilor „genotip” - „vârsta explantului” în baza frecvenţei calusogenezei 65
3.1.3. Capacitatea de regenerare a plantulelor din calusul obţinut de la embrionii maturi de triticale 67
3.1.4. Variabilitatea indusă de cultura *in vitro* la celulele calusale în baza frecvenței și spectrului aberațiilor cromozomiale 72
3.2. Variabilitatea indusă de razele gama în cultura *in vitro* la triticale 77
3.2.1. Efectul dozelor razelor gama în procesul mutațional declanșat în celulele calusale 78
3.2.2. Impactul radiaţiei gama asupra acumulării masei calusale şi regenerării plantulelor 82
3.2.3. Influența razelor gama asupra proceselor morfogenetice 85
3.3. Obținerea regeneranților de triticale prin metoda *in vitro* și mutageneza fizică 87
Concluzii la Capitolul 3 93

4. ASPECTE GENETICE A GENOTIPURILOR DE TRITICALE OBȚINUTE PRIN MUTAGENEZA FIZICĂ ȘI CULTURA *IN VITRO* 96
4.1. Evaluarea caracterelor biomorfologice la somaclonele de triticale obținute din embrioni iradiați cu raze gama ……..……..……..……. 96
4.2. Analiza polimorfismului genetic al somaclonelor SC_1 la triticale ……..……..…… 105
4.3. Expresia caracterelor cantitative ale somaclonelor SC_2 de triticale recuperate din variantele supuse iradierii și culturii *in vitro* ……..……..... 115
4.4. Studiul variabilității fenotipice și genotipice a unor caractere cantitative ale somaclonelor SC_1 și SC_2 de triticale ……..…..……..….. 122
Concluzii la Capitolul 4 132

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI 134
BIBLIOGRAFIE 136
ANEXE 165
Anexa 1. Inducerea embriogenezei somatice și particularitățile regenerării indirecte din embrioni maturi la triticale ……..……..…… 165
Anexa 2. Analiza variaţiei masei calusului urmare a iradierii cu diferite doze …..... 166
Anexa 3. Influenţa interacțiunii factorilor genotip-radiaţie gama asupra frecvenţei morfogenezei ……..……. 167
Anexa 4. Variația caracterelor biomorfologice ale somaclonelor SC_1 de triticale ….. 168
Anexa 5. Analiza varianţei indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 (testul ANOVA) ……..… 169
Anexa 6. Analiza varianţei indicilor biomorfologici la somaclonele SC_2 (testul ANOVA) ……. 171
Anexa 7. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire ……..... 173
Anexa 8. Acte de implementare a rezultatelor științifice în cercetare ……..…….. 174
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII 176
CV-UL AUTORULUI 177

ADNOTARE

Ciobanu Renata „Variabilitatea somaclonală și indusă de radiație la triticale *in vitro*”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2023.

Structura tezei: teza include introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 380 de titluri, 8 anexe, 123 pagini text de bază, 43 figuri, 31 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 16 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: cultura *in vitro*, radiație gama, variabilitate somaclonală și indusă, aberații cromozomiale, polimorfismul fragmentelor ADN, somaclone, caractere cantitative.

Domeniul de studiu:162.01 – Genetică vegetală

Scopul lucrării constă în studiul variabilității somaclonale induse de radiație în cultura *in vitro* la triticale, evidențierea particularităților biomorfologice și estimarea variabilității genetice în selectarea formelor cu caractere valoroase pentru ameliorare.

Obiectivele cercetării: selectarea și optimizarea mediilor de cultură pentru inițierea calusogenezei și regenerării indirecte de plantule din embrioni maturi de triticale; estimarea frecvenței și spectrului aberațiilor cromozomiale induse în cultura *in vitro* la celulele calusale; evaluarea efectului dozelor razelor gama în declanșarea procesului mutațional pentru diversificarea spectrului variabilității genetice în cultura *in vitro*; stabilirea influenței razelor gama asupra calusogenezei, morfogenezei și regenerării de plantule; analiza variabilității somaclonale, determinarea gradului de influență a razelor gama și culturii *in vitro* asupra caracterelor cantitative la somaclonele de triticale; evaluarea variabilității genetice a somaclonelor prin evidențierea polimorfismului genetic, utilizând tehnica de analiză moleculară RAPD; aprecierea variației și a parametrilor genetici a unor caractere cantitative la somaclonele de triticale.

Noutatea și originalitatea științifică. Studiul complex al răspunsului *in vitro* al embrionilor maturi de triticale a permis obținerea rezultatelor principial noi privind majorarea variabilității somaclonale bazate pe suplinirea instabilității genomului prin aplicarea razelor gama. Rezultatele privind modificările calusogenezei, morfogenezei și regenerării oferă fundamente teoretice și practice în elucidarea mecanismelor ce asigură totipotența și determină proliferarea celulară. Studiul molecular-genetic al polimorfismului ampliconilor RAPD la somaclonele de triticale demonstrează eficiența aplicării culturii *in vitro* și radiației ionizante în generarea variabilității genetice la plantele cu genom complex. Abordarea inovativă în evaluarea regeneranților bazate pe analiza variației și nivelului heritabilității caracterelor cantitative a scos în evidență efectele genetice și de mediu în predicția genotipurilor cu însușiri valoroase.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constau în fundamentarea științifică a potențialului de inducere a variabilității genetice prin implementarea tehnicilor culturii *in vitro* și mutagenezei experimentale, ceea ce a contribuit la elaborarea procedeului de obținere și evidențiere a variabilității, fapt ce permite eficientizarea procesului de ameliorare și crearea de noi somaclone cu randamente sporite.

Semnificația teoretică. Studiul realizat a permis obținerea datelor noi ce confirmă principiul totipotenței celulare și descriu particularitățile embriogenezei și regenerării *in vitro* a plantelor de triticale prin sporirea instabilității genomului de către razele gama. În baza cercetărilor fenologice, biometrice, citologice și molecular-genetice a fost argumentată variabilitatea somaclonală și posibilitatea sporirii diversității genetice la triticalele hexaploide.

Valoarea aplicativă. Ca rezultat al cercetărilor științifice a fost optimizată metoda de utilizare a radiației gama în cultura de țesuturi la triticale pentru a diversifica spectrul variabilității genetice somaclonale. S-a stabilit efectul radiației ionizante asupra proceselor de calusogeneză, morfogeneză și regenerare de plantule. A fost determinat gradul de influență a razelor gama comparativ cu cultura *in vitro* asupra manifestării unor caractere cantitative la somaclonele de triticale, în baza rezultatelor s-a demonstrat posibilitatea majorării variabilității genetice. S-a identificat spectrul polimorfic și modul de moștenire al ampliconilor RAPD la somaclonele a 3 genotipuri de triticale. Estimarea coeficientului heritabilității a caracterelor cantitative la triticale, permite de a prognoza eficient și veridic selectarea celor mai valoroase somaclone, care pot fi antrenate în procesul de ameliorare.

Implementarea rezultatelor științifice. Datele obținute privind asocierea mutagenezei experimentale și culturii *in vitro* a embrionilor de triticale în vederea sporirii variabilității somaclonale au servit în calitate de material științifico-didactic pentru cursul de genetică și biotehnologie. Somaclonele SC_2-SC_3 ale genotipurilor Ingen 93 (*in vitro* și RAD) și 188 TR 5021 (RAD) au fost depuse în Banca de gene a Laboratorului Resurse genetice vegetale și transmise grupului de cercetători Genetica și ameliorarea cerealelor păioase a laboratorului Genetică aplicată din cadrul IGFPP al USM pentru includerea acestora în programele de ameliorare, fiind considerate de perspectivă.

ANNOTATION

Ciobanu Renata "Somaclonal and radiation – induced variability in triticale *in vitro*", PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2023.

Structure of the thesis: the thesis includes introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography composed of 380 titles, 8 annexes, 123 pages of basic text, 43 figures, 31 tables. The obtained results are published in 16 scientific papers.

Keywords: *in vitro* culture, gamma radiation, somaclonal and induced variability, chromosomal aberrations, polymorphism of DNA fragments, somaclones, quantitative traits.

Field of study: 162.01 – Plant Genetics

The aim of there search: consists in the study of radiation-induced somaclonal variability in triticale culture *in vitro*, the highlighting of the biomorphological particularities and the estimation of the genetic variability for the selection of forms with valuable characters for improvement.

Objectives: the selection and optimization of the culture medium for the initiation of callusogenesis and the indirect regeneration of seedlings from mature triticale embryos; estimation of the frequency and spectrum of chromosomal aberrations induced in *in vitro* culture in callus cells; evaluation of the effect of gamma ray doses in triggering the mutational process to diversify the spectrum of genetic variability in *in vitro* culture; establishing the influence of gamma rays on callusogenesis, morphogenesis and seedling regeneration; analysis of somaclonal variability, determination of the degree of influence of gamma rays and *in vitro* culture on quantitative traits in triticale somaclones; evaluation of the genetic variability of somaclones by highlighting the genetic polymorphism using the RAPD analysis technique; evaluation of the variance and genetic parameters of some quantitative traits in triticale somaclones.

Scientific novelty and originality: the complex study of the *in vitro* response of mature triticale embryos allowed obtaining fundamentally new results regarding the increase of somaclonal variability based on the replacement of genome instability by the application of gamma rays. The results regarding the changes in callusogenesis, morphogenesis and regeneration provide theoretical and practical foundations in the elucidation of the mechanisms that ensure totipotency and determine cell proliferation. The molecular-genetic study of the polymorphism of RAPD amplicons in triticale somaclones demonstrates the efficiency of the application of *in vitro* culture and ionizing radiation in the generation of genetic variability in plants with complex genomes. The innovative approach in the evaluation of regenerants based on the analysis of the variance and the level of heritability of quantitative characters highlighted the genetic and environmental effects in the prediction of genotypes with valuable traits.

Important scientific problem solved: consists in the scientific substantiation of the potential for inducing genetic variability by implementing the techniques of *in vitro* culture and experimental mutagenesis, which contributed to the development of the procedure for obtaining and highlighting the variances, a fact that allows the improvement process to be made more efficient and the creation of new somaclones with increased yields .

The theoretical significance of work: the study made it possible to obtain new data that confirm the principle of cellular totipotency and describe the particularities of embryogenesis and *in vitro* regeneration of triticale plants by increasing the instability of the genome by gamma rays. Based on phenological, biometric, cytological and molecular - genetic researches, somaclonal variability and the possibility of increasing genetic diversity in hexaploid triticale were argued.

Applicative value: as a result of scientific research, the method of using gamma radiation in triticale tissue culture was optimized to diversify the spectrum of somaclonal genetic variability. The effect of ionizing radiation on the processes of callusogenesis, morphogenesis and seedling regeneration was determined. The degree of influence of gamma rays compared to *in vitro* culture on the manifestation of some quantitative traits in triticale somaclones was determined, based on the results it was demonstrated the possibility of increasing the genetic variability. The polymorphic spectrum and mode of inheritance of RAPD amplicons in somaclones of 3 triticale genotypes were identified. Estimating the heritability coefficient of the cantitative characters in triticale, allows to efficiently and truthfully forecast the selection of the most valuable somaclones, which can be trained in the breeding process.

Implementation of scientific results: The data obtained regarding the association of experimental mutagenesis and *in vitro* culture of triticale embryos in order to increase somaclonal variability served as scientific-didactic material for the genetics and biotechnology course. The SC_2 - SC_3 somaclones of the genotypes Ingen 93 (*in vitro* and RAD) and 188 TR 5027 (RAD) were deposited in the Genebank of the Laboratory of Plant Genetic Resources and forwarded to the research group Genetics and Breeding of Grass Grains of the Laboratory of Applied Genetics of the IGPPP of the MSU for their inclusion in the improvement programs, being considered perspective.

АННОТАЦИЯ

Чёбану Рената «Сомаклональная и радиационно-индуцированная изменчивость тритикале *in vitro*», Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинэу, 2023

Структура диссертации: диссертация включает введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, библиографию из 380 названия, 8 приложений, 123 страниц основного текста, 43 рисунка, 31 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 16 научных работ.

Ключевые слова: культура *in vitro*, гамма-излучение, сомаклональная и индуцированная изменчивость, хромосомные аберрации, полиморфизм фрагментов ДНК, сомаклоны, количественные признаки.

Область исследования: 162.01 – Генетика растений

Цель исследования: изучение сомаклональной изменчивости, индуцируемой в культуре *in vitro* тритикале, выявление биоморфологических особенностей и оценка генетической изменчивости для отбора форм с селекционно- ценными признаками.

Задачи исследования: подбор и оптимизация питательных сред для инициации каллусогенеза и регенерации проростков из зрелых зародышей тритикале; оценка частоты и спектра хромосомных аберраций, индуцированных в культуре *in vitro* в каллусных клетках; оценка влияния доз гамма-излучения на инициирование мутационного процесса для диверсификации спектра генетической изменчивости в культуре *in vitro*; установление влияния гамма-лучей на каллусогенез, морфогенез и регенерацию проростков; анализ сомаклональной изменчивости, определение степени влияния гамма-излучения и культуры *in vitro* на количественные признаки сомаклонов тритикале; оценка генетической изменчивости сомаклонов путем выделения генетического полиморфизма с использованием методики RAPD-анализа; оценка дисперсии и генетических параметров некоторых количественных признаков у сомаклонов тритикале.

Научная новизна и оригинальность: комплексное изучение реакции *in vitro* зрелых зародышей тритикале позволило получить принципиально новые результаты относительно повышения сомаклональной изменчивости на основе увеличения нестабильности генома применением гамма-лучей. Результаты, касающиеся изменений в каллусогенезе, морфогенезе и регенерации, создают теоретическую и практическую основу для выяснения механизмов, обеспечивающих тотипотентность и определяющих пролиферацию клеток. Молекулярно-генетическое изучение полиморфизма RAPD-ампликонов в сомаклонах тритикале демонстрирует эффективность применения культуры *in vitro* и ионизирующего излучения для формирования генетической изменчивости у растений со сложным геномом. Инновационный подход в оценке регенерантов, основанный на анализе дисперсии и уровня наследуемости количественных признаков, позволил выделить эффекты среды и генетические для прогнозирования генотипов с ценными признаками.

Полученные результаты, способствующие решению важной задачи, заключаются в научном обосновании возможности индуцирования генетической изменчивости путем использования методов культивирования *in vitro* и экспериментального мутагенеза, что способствовало разработке методики индуцирования и оценки изменчивости для повышения эффективности селекционного процесса и создания новых сомаклонов с повышенной продуктивностью.

Теоретическое значение. Исследование позволило получить новые данные, подтверждающие принцип клеточной тотипотентности и характеризующие особенности эмбриогенеза и регенерации *in vitro* тритикале путем увеличения нестабильности генома под действием гамма-лучей. На основании фенологических, биометрических, цитологических и молекулярно-генетических исследований доказана сомаклональная изменчивость и возможность увеличения генетического разнообразия у гексаплоидноых тритикале.

Прикладное значение. В результате научных исследований оптимизирован метод использования гамма-излучения в культуре тканей тритикале для диверсификации спектра сомаклональной генетической изменчивости. Установлено влияние ионизирующего излучения на процессы каллусогенеза, морфогенеза и регенерации проростков. Определена эффективность влияния гамма-лучей по сравнению с культурой *in vitro* на проявление некоторых количественных признаков у сомаклонов тритикале, на основании полученных результатов показана возможность повышения генетической изменчивости. Выявлены полиморфный спектр и характер наследования RAPD-ампликонов в сомаклонах трех генотипов тритикале. Оценка коэффициента наследуемости количественных признаков у тритикале позволяет эффективно и достоверно прогнозировать отбор наиболее ценных сомаклонов, которые могут быть вовлечены в селекционный процесс.

Внедрение научных результатов. Полученные данные об объединении экспериментального мутагенеза и культивирования *in vitro* зародышей тритикале с целью повышения сомаклональной изменчивости послужили научно-методическим материалом для курса генетики и биотехнологии. Сомаклоны SC_2-SC_3 генотипов Ingen 93 (*in vitro* и RAD) и 188TR 5021 (RAD), как перспективные генотипы, переданы в Генбанк Лаборатории Генетических ресурсов растений и в научную группу «Генетика и селекция злаков» лаборатории Прикладной генетики ИГФЗР МГУ для использования в селекционных программах.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. Suprafața de triticale recoltată la nivel mondial și cantitatea de producție (FAO Stat 2016) ……..……... 31

Tabelul 1.2. Producătorii de triticale în 2020 (Source: UNFoodand Agriculture Organization) ……..... 32

Tabelul 2.1. Componenţa mediului Murashige-Skoog (MS) ……. 52

Tabelul 2.2. Lista primerilor microsatelitici utilizați pentru analiza RAPD ……..... 56

Tabelul 3.1. Compoziția mediilor de cultură pentru inducerea calusogenezei și embriogenezei ……..….. 61

Tabelul 3.2. Influenţa compoziţiei mediilor de cultură asupra frecvenţei calusogenezei din embrioni maturi la diferite genotipuri de triticale …… 63

Tabelul 3.3. Analiza varianţei frecvenţei calusogenezei din embrioni maturi ……..... 64

Tabelul 3.4. Analiza varianţei frecvenţei calusogenezei induse din fragmente foliare . 67

Tabelul 3.5. Capacitatea de regenerare și înrădăcinare a plantelor obținute din calus embriogen …….……..……..... 71

Tabelul 3.6. Analiza varianţei şi contribuţia genotipului asupra frecvenţei calusogenezei şi regenerării (testul ANOVA) ……..… 71

Tabelul 3.7. Determinarea termenului optim de fixare a probelor de calus pentru studii citologice ……..... 73

Tabelul 3.8. Analiza activității mitotice și cotei celulelor calusale cu aberații …….. 74

Tabelul 3.9. Analiza varianţei frecvenței calusogenezei în dependență de doza de radiație gama și genotip ……...… 82

Tabelul 3.10. Regenerarea prin embriogeneză somatică a genotipurilor de triticale iradiate cu raze gama la doza de 150 Gy ……... 85

Tabelul 3.11. Analiza varianţei masei calusului …….. 85

Tabelul 3.12. Analiza variației morfogenezei …….……..……. 87

Tabelul 3.13. Analiza varianței frecvenței regenerarii de plantule …….……. 88

Tabelul 3.14. Frecvența calusogenezei, embriogenezei, regenerării *in vitro* la genotipurile de triticale supuse iradierii gama ……... 91

Tabelul 4.1. Particularități ale primerilor RAPD analizați la formele de triticale ……. 111

Tabelul 4.2. Secvențe nucleotidice specifice identificate în baza analizei cu primeri RAPD la genotipurile de triticale …….……. 113

Tabelul 4.3. Variația caracterelor *numărul de frați fertili, talia plantei, lungimea spicului principal* și *lungimea ultimului internod* la somaclonele SC_2 de triticale ……..… 118

Tabelul 4.4. Variația caracterelor productivității la somaclonele SC_2 de triticale ….. 120

Tabelul 4.5. Analiza varianței indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului Ingen 35 (testul ANOVA) ……..… 122

Tabelul 4.6. Analiza varianței indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului Ingen 93 (testul ANOVA) ……..… 123

Tabelul 4.7. Analiza varianței indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului 188TR 5021 (testul ANOVA) ……..…... 124

Tabelul 4.8. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 35 …… 125

Tabelul 4.9. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 35 ……. 125

Tabelul 4.10. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 93 ……..…….. 128

Tabelul 4.11. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 93 ……. 128
Tabelul 4.12. Estimarea variației și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul 188TR 5021 ……..… 129
Tabelul 4.13. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul 188TR 5021 ... 130

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1. Harta zonelor de cultivare a triticalelor din lume (http://eol.org/). ……..…. 32
Fig. 3.1. Tipurile de calus inițiate: A – calus compact (tip I); B – calus friabil (tip II). …..... 62
Fig. 3.2. Tipul de calus format în dependență de mediul de cultură ……...… 63
Fig. 3.3. Influența interacțiunii factorilor „genotip" – „vârsta explantului" asupra frecvenței calusogenezei ……..…….... 66
Fig. 3.4. Inițierea proceselor regenerative ……..……..… 68
Fig. 3.5. Iniţierea proceselor morfogenetice …….……. 68
Fig. 3.6. Apariţia şi dezvoltarea lăstarilor per calus …… 70
Fig. 3.7. Influenţa genotipului asupra numărului de lăstari regeneraţi ……..…..…..... 70
Fig. 3.8. Somaclone de triticale la diferite faze de creştere: A – faza de vegetație - înfrățire, stadiul de vegetație - tulpina principală + 2 - 4 frați; B, C – faza de vegetație - înspicat, stadiul de vegetație - 20% din inflorescență vizibilă …. 72
Fig. 3.9. Heterogenitatea celulelor calusale de triticale (192 ore de cultivare după pasaj de la inițierea calusogenezei): A – celule mari, mici, alungite; B – celule mari; C – celule alungite (fusiforme) ……. 74
Fig. 3.10. Celule calusale în diverse faze mitotice: profază, anafază, telofaza ……...…. 75
Fig. 3.11. Celule calusale în diverse faze mitotice: profază, metafază, anafază …….. 75
Fig. 3.12. Mutații mitotice în celulele calusale: A – anafază cu un fragment cromozomial; B – celulă binucleată; C – dispunerea ciclică a cromozomilor .. 76
Fig. 3.13. Inițierea calusogenezei din embrioni maturi la martor și diferite doze de iradiere ……. 80
Fig. 3.14. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţia gama asupra frecvenţei calusogenezei ……... 81
Fig. 3.15. Creșterea biomasei calusale a genotipului Ingen 35: A – varianta martor; B – varianta iradiată cu 50 Gy 83
Fig. 3.16. Variația masei calusului în dependență de doza de iradiere 150 Gy în comparație cu martorul 84
Fig. 3.17. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţie gama asupra frecvenţei morfogenezei …… 86
Fig. 3.18. Calus morfogen cu formarea lăstarilor la genotipul Ingen 93: A – varianta martor; B – iradiere 100 Gy; C – iradiere 150 Gy; D – iradiere 200 Gy …..… 87
Fig. 3.19. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţie asupra frecvenţei regenerării 88
Fig. 3.20. Lăstari regeneraţi la diferite doze de iradiere și a martorului, după 30 zile …. 89
Fig. 3.21. Influenta genotipului și a radiatiei gama (150 Gy) asupra numărului de lastari regenerați ……..…. 90
Fig. 4.1. Variantele experimentale a genotipului Ingen 93 la diferite faze de vegetație: A – martor; B – iradiere; C – cultura *in vitro* ……..…. 97
Fig. 4.2. Variația caracterului *talia plantei* la somaclonele de triticale (SC_1) ….…….. 98
Fig. 4.3. Caracterul *talia plantei* la somaclonele SC_1 a genotipului Ingen 35: A – martorul; B – varianta iradiată; C – varianta *in vitro* …… 99
Fig. 4.4. Caracterul *talia plantei* la somaclonele SC_1 a genotipului 188TR 5021: A – martorul; B, C – variantele iradiate; B – semipitice; C – pitice; D – variantele obținute *in vitro* 99
Fig. 4.5. Variația caracterului *numărul de frați fertili per plantă* la somaclonele de triticale (SC_1) ……..…. 100

Fig. 4.6. Caracterul lungimea spicului principal la somaclonele SC_1 genotipul 188TR 5021: A – martorul; B – varianta *in vitro*; C – varianta iradiată, sterilă ….... 100
Fig. 4.7. Variația caracterului *lungimea spicului principal* la somaclonele de triticale (SC_1) ……..… 101
Fig. 4.8. Variația caracterului *lungimea ultimului internod* la somaclonele de triticale (SC_1) …… 101
Fig. 4.9. Variația caracterului *numărul de boabe* la somaclonele de triticale (SC_1)…. 102
Fig. 4.10. Variația caracterului *greutatea boabelor* la somaclonele de triticale (SC_1) .. 103
Fig. 4.11. Variația caracterului *masa a 1000 de boabe* la somaclonele de triticale (SC_1) 103
Fig. 4.12. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPA11 (A) și OPB14 (B) ……. 106
Fig. 4.13. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPB12 (A) și OPC05 (B) ……..… 107
Fig. 4.14. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPC07 (A) și OPD07 (B) ……. 108
Fig.4.15. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPE17 (A) și OPF08 (B) …….. 109
Fig. 4.16. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPG06 (A) și OPG10 (B) ……...…….. 110
Fig. 4.17. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPH15 (A) și OPI16 (B) ……..……..... 111
Fig. 4.18. Gruparea formelor de triticale în baza genotipării RAPD prin analiza UPGMA (*Unweighted Pair Group Methodwith Arithmetic Mean*) ……. 114
Fig.4.19. Variantele experimentale a somaclonelor SC_2 a genotipului Ingen 93 la diferite faze de vegetație: A – martor; B – iradiate; C – cultura *in vitro* ….… 115
Fig. 4.20. Variantele experimentale a somaclonelor SC_2, genotipul 188TR 5021 la diferite faze de vegetație: A – înflorire completă (martor); B, C – faza de vegetație înspicat; B – iradiat; C – cultura *in vitro* ……..…….. 116
Fig. 4.21. Variația morfologică a spicului la somaclonele SC_2, genotipul Ingen 93: A – martor; B, C – variantele *in vitro*; B – spic ramificat; C – apariția spiculețelor secundare …….…. 117

LISTA ABREVIERILOR

ANOVA Analiza varianţei sau analiza dispersională (Analysis of Variance)

2,4-D acid 2,4 – diclorfenoxiacetic

AIA acid 3 **–** indolilacetic

AIB acid 3 **–** indolilbutiric

ANA acid – naftilacetic

AG avantaj genetic

BAP benziladenină (sau 6-benzilaminopurină)

CV coeficient de variație

CVF coeficient de variație fenotipică

CVG coeficient de variație genotipică

h^2 heritabiliatatea în sens larg

KIN chinetină

MS Murashige-Skoog

PCR reacţia de polimerizare în lanţ (*Polymerase Chain Reaction*)

PIC conținutul informației polimorfe (*Polymorphic Information Content*)

RAPD ADN ADN polimorf amplificat arbitrar (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

UPGMA metoda de grupare a perechilor neponderate în baza mediilor aritmetice (*Unweighted Pair Group Methodwith Arithmetic Mean*)

Vph varianța fenotipică

Vg varianța genotipică

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei

Securitatea alimentară în condițiile unei explozii demografice este una dintre cele mai dificile probleme globale. Tehnologiile moderne intensive pentru cultivarea plantelor agricole au atins limitele „saturației" în mai multe aspecte:

- ecologic (poluarea mediului natural și suprimarea mecanismelor de autoreglare a acestuia); energetic (creștere exponențială a costului energiei neregenerabile pentru fiecare unitate suplimentară de producție);

- productiv (creșterea în continuare a dozelor de îngrășăminte cu azot și a ratelor de irigare duce la inhibarea dezvoltării plantelor cultivate, a organismelor din sol, reduce rezistența agrocenozelor la stresul abiotic și biotic, atingerea indicelui maxim de randament pentru multe culturi) [379].

Alegerea triticalelor ca obiect de studiu este asociată cu o combinație unică în această cultură a unui număr de caracteristici economice și biologice inerente speciilor originale - grâu și secară. Aceste însușiri includ un randament ridicat al cerealelor și al masei verzi, proprietăți adaptive crescute (rezistență ridicată la iernat, rezistență la secetă, nesolicitare la sol), imunitate complexă la boli fungice, conținut ridicat de proteine și lizină, precum și alți nutrienți [200; 273]. Datorită spectrului larg de utilizare al triticalelor (alimentație umană, hrana animalelor, producția de biocombustibil) este extrem de importantă îmbunătățirea constantă a formelor existente și crearea de noi soiuri [200]. Pentru ameliorarea triticalelor, este necesară îmbogățirea fondului genetic al acestei culturi și creșterea eficienței selecției printr-o varietate de metode.

Actualmente un rol important este atribuit metodelor clasice de ameliorare cu tehnici moderne de cercetare și studii comparative la nivel morfologic, fiziologic, genetic și molecular. Ca strategie, integrarea tehnicilor de cultură de țesuturi cu programele de ameliorare oferă un potențial semnificativ pentru creșterea diversității genetice a culturilor. Prin urmare, biotehnologiile *in vitro* pot fi o soluție potențială pentru manipularea caracterelor, îmbogățirea bazei genetice și recuperarea variației dorite [61].

Inducerea mutațiilor este în prezent o strategie bine stabilită în ameliorarea plantelor care poate suplimenta germoplasmele existente și îmbunătăți soiurile cu anumite calități. Ca rezultat al mutațiilor, somaclonele obținute pot deține noi combinații alelice, care la rândul lor condiționează ameliorarea caracterelor utile. Actualmente în baza de date FAO/IAEA sunt înregistrate peste 3.200 de soiuri de plante, care au fost produse prin mutageneză [109; 307].

Mutageneza indusă *in vitro* cu ajutorul razelor gama este cea mai eficientă alternativă pentru schimbarea fundalului genomic, pentru creșterea frecvenței genelor sau alelelor dorite, generând tipuri de mutații specifice, crescând artificial diversitatea genetică a trăsăturilor importante din punct de vedere agronomic în programele de ameliorare a plantelor cu frecvență mai mare decât mutațiile spontane [33; 77; 181; 226; 330].

Evaluarea variabilității genetice constituie un aspect important în studiile fundamentale, care evidențiază eterogenitatea, efectele mutaționale și recombinaționale, interacțiunea genelor și efectele reciproce, precum și în studiile aplicative, care permit selectarea genotipurilor pentru obținerea rezultatelor cu eficacitate sporită în programele de ameliorare ale cerealelor [77].

Cultivarea triticalelor în Republica Moldova a început încă din anii '70 a secolului trecut. Dezvoltarea activă a modelelor genetice și de ameliorare pentru obținerea materialului inițial și crearea de noi soiuri de triticale a fost realizată cu succes pe parcursul anilor de mai mulți cercetători [25; 375]. În legătură cu schimbările climatice înregistrate în ultimii ani (fiecare al doilea - treilea an fiind an secetos), problema creșterii capacității de adaptare a culturilor agricole este extrem de importantă, iar cultura de triticale în Republica Moldova a căpătat o semnificaţie economică recunoscută pentru alimentaţia umană, industrie şi furajarea animalelor [26; 372].

Utilizarea variabilității somaclonale induse de radiație în cultura *in vitro* la triticale nu este valorificată pe deplin, iar studierea mutațiilor apărute poate contribui la facilitarea procesului de selectare a genotipurilor cu caractere valoroase din punct de vedere economic.

Rezultatele prezentate în lucrare pot oferi noi perspective în crearea noilor varietăți de triticale cu productivitate sporită, cu caractere cantitative și calitative îmbunătățite prin implementarea mutagenezei induse în cultura *in vitro*.

Scopul lucrării constă în studiul variabilității somaclonale induse de radiație în cultura *in vitro* la triticale, evidențierea particularităților biomorfologice şi estimarea variabilității genetice în selectarea formelor cu caractere valoroase pentru ameliorare.

Obiectivele cercetării:

- selectarea și optimizarea mediilor de cultură pentru inițierea calusogenezei și regenerării indirecte de plantule din embrioni maturi de triticale;
- estimarea frecvenței și spectrului aberațiilor cromozomiale induse în cultura *in vitro* la celulele calusale;
- evaluarea efectului dozelor razelor gama în declanșarea procesului mutațional pentru diversificarea spectrului variabilității genetice în cultura *in vitro*;

- stabilirea influenței razelor gama asupra calusogenezei, morfogenezei și regenerării de plantule;
- analiza variabilității somaclonale, determinarea gradului de influență a razelor gama și culturii *in vitro* asupra caracterelor cantitative la somaclonele de triticale;
- evaluarea variabilității genetice a somaclonelor prin evidențierea polimorfismului genetic, utilizând tehnica de analiză moleculară RAPD;
- aprecierea variației și a parametrilor genetici a unor caractere cantitative la somaclonele de triticale.

Ipoteza de cercetare este bazată pe definițiile conceptuale ale variabilității care este condiționată de factori genetici, epigenetici și de mediu, cu posibilitatea de amplificare prin utilizarea razelor gama în complex cu cultura *in vitro.*

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme ştiinţifice importante constau în fundamentarea științifică a potențialului de inducere a variabilității genetice prin implementarea tehnicilor culturii *in vitro* și mutagenezei experimentale, ceea ce a contribuit la elaborarea procedeului de obținere și evidențiere a variabilității, fapt ce permite eficientizarea procesului de ameliorare și creare de noi somaclone cu randamente sporite.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. Studiul ştiinţific și metodologia cercetării, care includ metode și tehnici justificative, selectate în cadrul acestei lucrări au permis soluționarea obiectivelor propuse. Pentru inducerea variabilității somaclonale a fost utilizată metoda culturii *in vitro* (elaborarea algoritmului de la mediile nutritive pentru inițierea culturii *in vitro* și regenerării de plantule) și mutageneza experimentală (prin iradiere cu raze gama). Cu ajutorul metodelor biometrice au fost evaluate caracterele cantitative ale somaclonelor de triticale. Estimarea variabilității genetico-moleculare a fost realizată prin analiza RAPD, tehnică rapidă de identificare a polimorfismului genomic, utilizând 12 primeri arbitrari. Similaritatea genetică a genotipurilor a fost stabilită în baza distanțelor genetice și a indicilor de similaritate prin metoda construirii dendrogramelor de repartiție. Aprecierea rolului genotipului, culturii *in vitro,* radiației gama și interacţiunii acestor factori ca surse de variaţie a caracterelor cantitative a fost bazată pe analiza mono- şi bifactorială a varianţei ANOVA. Prelucrarea statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul pachetului de programe Statgraphics Plus 5.0.

Strategia de cercetare prezentată în lucrarea de față poate fi aplicată cu succes asupra studiului pentru diferite specii cerealiere, inclusiv cu genom complex, în scopul selectării, identificării și introducerii în cultură a formelor cu caractere economic valoroase.

Semnificaţia teoretică. Studiul realizat a permis obținerea datelor noi ce confirmă principiul totipotenței celulare și descriu particularitățile embriogenezei și regenerării *in vitro* a plantelor de triticale prin sporirea instabilității genomului de către razele gama. În baza cercetărilor fenologice, biometrice, citologice și molecular-genetice a fost argumentată variabilitatea somaclonală și posibilitatea sporirii diversității genetice la triticalele hexaploide.

Valoarea aplicativă a lucrării. Ca rezultat al cercetărilor științifice a fost optimizată metoda de utilizare a radiației gama în cultura de țesuturi la triticale pentru a diversifica spectrul variabilității genetice somaclonale. S-a stabilit efectul radiației ionizante asupra proceselor de calusogeneză, morfogeneză și regenerare de plantule. A fost determinat gradul de influență a razelor gama comparativ cu cultura *in vitro* asupra manifestării unor caractere cantitative la somaclonele de triticale, în baza rezultatelor s-a demonstrat posibilitatea majorării variabilității genetice. S-a identificat spectrul polimorfic și modul de moștenire al ampliconilor RAPD la somaclonele a 3 genotipuri de triticale. Estimarea coeficientului heritabilității caracterelor cantitative la triticale, permite de a prognoza eficient și veridic selectarea celor mai valoroase somaclone, care pot fi antrenate în procesul de ameliorare.

Aprobarea rezultatelor ştiinţifice

Cercetările realizate și datele obținute au fost prezentate și discutate anual la ședințele Consiliilor științifice al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP), precum și în cadrul întrunirilor științifice naționale și internaționale de specialitate: Conferința științifică în memoria academicianului Boris Matienco, „Structura și funcționalitatea sistemelor biologice – diversitate și universalitate”, 17 noiembrie 2011, Chişinău; Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția. III, 24 - 25 octombrie 2013, Chişinău; Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor”, Ediția V, 23 - 24 octombrie 2014, Chişinău; Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția. IV, 3 - 4 octombrie 2016, Chişinău; Conferința științifică cu participare internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”, Ediția II, 23 noiembrie 2018, Chișinău; Conferința științifică națională cu participare internațională „Ştiinţele vieţii în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”, 21 - 22 octombrie 2019, Chişinău; Simpozionul ştiinţific internaţional „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția V, 21 - 22 octombrie 2019, Chişinău; Conferința Științifico - practică cu participare internaţională „Realizări științifice în ameliorare și tehnologii inovative la culturile cerealiere în contextul schimbărilor climaterice”, 4-5 septembrie 2020, Pașcani; Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor”, Ediția VII, 4-5 octombrie

2021, Chișinău; The National Conference with international participation „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community", Ediția II, 29 - 30 septembrie 2022, Chișinău; Simpozionul ştiinţific internaţional „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective", Ediția VI, 3 - 4 octombrie 2022, Chișinău.

Sumarul compartimentelor tezei

Lucrarea cuprinde adnotarea prezentată în limbile – română, engleză şi rusă, lista abrevierilor, tabelelor și figurilor, introducere, patru capitole, concluzii generale şi recomandări practice, bibliografie, anexe, acte de implementare a rezultatelor științifice, declaraţia privind asumarea răspunderii şi CV.

În **Introducere** se argumentează actualitatea şi importanţa problemei abordate, sunt formulate scopul şi obiectivele tezei, noutatea ştiinţifică a rezultatelor obţinute, importanţa teoretică şi valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor şi este inclus sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul I „Concepte genetice de sporire a variabilității genetice la plantele de cultură" conține analiza datelor din literatura de specialitate privind importanța variabilității somaclonale la plante. Este expusă importanța utilizării marcherilor morfologici, citologici, biochimici și moleculari în vederea identificării, ameliorării şi introducerii în cultură a formelor noi de triticale cu caractere economic valoroase. Prin urmare, acest capitol s-a axat pe următoarele aspecte: răspândirea și valoarea economică a triticalelor; sinteza cercetărilor privind fenomenul de inducere *in vitro* a variabilității genetice, evidențierea mecanismelor de inducere a variabilității și a factorilor majori care influențează variațiile somaclonale induse la plantele derivate prin culturi *in vitro* și mutageneză experimentală.

Capitolul II „Caracteristica materialului biologic și metodelor de cercetare" include obiectul de studiu și descrierea metodologiei de cercetare utilizată pentru realizarea studiului: metode biotehnologice (prepararea mediilor nutritive, inocularea explantelor, subcultivarea calusului, aclimatizarea plantulelor), metode morfometrice (observații fenologice și analiza caracterelor cantitative), citologice (determinarea cotei celulelor cu aberaţii în mitoză), moleculare (extragerea ADN, amplificarea și electroforeza) prin genotiparea RAPD privind estimarea polimorfismului și descrierea variabilității, precum şi aplicarea metodelor statistice de prelucrare a datelor experimentale.

Capitolul III „Aprecierea potențialului morfogenetic și regenerativ al genotipurilor de triticale în cultura *in vitro*" include rezultatele privind selectarea și optimizarea mediilor de cultură pentru inițierea calusogenezei și regenerării de plantule. Sunt evidențiate influența interacțiunii factorilor „genotip" - „vârsta explantului" asupra frecvenței calusogenezei,

descrierea capacității de regenerare. Conține studiul activității mitotice asupra cotei celulelor calusale cu aberații cromozomiale induse de cultura *in vitro*. Este descris efectul dozelor de iradiere cu raze gama declanșat în celulele calusale, asupra acumulării masei calusale și procesului de formare a lăstarilor; apreciată influența mutagenezei fizice asupra frecvenței morfogenezei și obținerii de regeneranți.

Capitolul IV „Caracteristica morfologică a genotipurilor de triticale obținute prin mutageneza fizică și cultura *in vitro*" conține rezultatele evaluării caracterelor biomorfologice (talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, numărul de boabe/spic, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe) în descrierea somaclonelor SC_1 și SC_2 de triticale obținute prin iradierea gama și cultura *in vitro*. Sunt analizate profilurile electroforetice ale ampliconilor RAPD la variantele incluse în cercetare și martor în baza a 12 primeri arbitrari. Apreciată variabilitatea caracterelor cantitative și stabilită puterea de influență a genotipului, razelor gama, culturii *in vitro* și interacțiunii lor ca sursă de variație. Include rezultate privind estimarea variației și a parametrilor genetici (variația genotipică și fenotipică, coeficientul de variație fenotipic și genotipic, heritabilitatea și avantajul genetic) a unor caractere cantitative descrise pentru somaclonele SC_1 și SC_2 de triticale.

Publicaţiile la tema tezei. Rezultatele obţinute sunt reflectate în 16 lucrări ştiinţifice: 1 articol în revistă din baza de date SCOPUS, 1 articol în revistă din Registrul Naţional al revistelor de profil, 8 articole în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale și internaționale, 6 teze în lucrările conferinţelor ştiinţifice naționale și internaționale, 4 comunicări în cadrul unor manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale.

În **Concluzii generale** și **Recomandări practice** sunt prezentate concluziile studiului de față și a posibilităților de implementare în practică a rezultatelor obținute.

Volumul şi structura tezei. Teza include adnotare, introducere, patru capitole, concluzii generale şi recomandări expusă pe 180 de pagini, inclusiv 43 figuri și 31 tabele. Bibliografia include 380 de surse din literatura de referință la tematica abordată, precum și 11 din cele mai importante lucrări științifice ale autorului.

1. CONCEPTE GENETICE DE SPORIRE A VARIABILITĂȚII GENETICE LA PLANTELE DE CULTURĂ

1.1. Rolul și importanța variabilității genetice la plantele de cultură

Evoluția plantelor de cultură, fie naturală, fie dirijată de om, se bazează în primul rând pe diversitatea genetică existentă în populație. Diversitatea care poate fi descrisă ca gradul de diferențiere între sau în interiorul speciilor, se află la baza tuturor programelor de amelorare a culturilor. Variabilitatea naturală și divergența dintre culturi au fost identificate pe scară largă și utilizate în îmbunătățirea speciilor de culturi de la începutul ameliorării sistematice a plantelor [20]. Cu toatea acestea, odată cu trecerea timpului, variabilitatea naturală s-a restrâns din cauza practicilor neregulate de reproducere, axate pe valorificarea doar a unor trăsături (randament, productivitate). De asemenea o influență negativă este condiționată de utilizarea frecventă doar a câtorva genotipuri selectate ca părinți în programul de dezvoltare a varietăților și introducerea unui număr limitat de linii remarcabile, ceea ce duce la o similaritate genetică crescută între soiurile moderne de culturi [66; 179].

Reducerea variabilității genetice și diversității dintre speciile plantelor de cultură provoacă îngrijorări serioase în rândul agricultorilor, deoarece devine extrem de dificilă ameliorarea în continuare a soiurilor de culturi pe fondalul creșterii permanente a cererii, condiționată de majorarea populației pe glob [276].

Degradarea mediului, creșterea excesivă, demografică și producțiile scăzute din agricultură din țările sărace ale lumii și distribuția inechitabilă a hranei, reprezintă cauzele majore ale insecurității alimentare. O pondere importantă o are și eroziunea diversității genetice a plantelor, care își extinde efectele și asupra șanselor de a identifica surse valoroase de gene pentru ameliorarea plantelor [20; 179].

Resursele genetice vegetale reprezintă un patrimoniu universal cu o valoare inestimabilă pentru întreaga omenire, devenind astfel de mare interes și actualitate [122]. Există informații care indică că 10% din speciile existente au primit denumiri științifice, reprezentând 250.000 – 300.000 de specii [20]. Dintre acestea 20% asigură 90% din cerințele alimentare, iar 9 specii acoperă 75% din necesarul de alimente și numai 4 specii: orezul, grâul, porumbul și cartoful furnizează 60% din acest necesar [112]. Pe baza acestor date pot fi constatate cauzele care au generat eroziunea genetică a multor resurse genetice vegetale. Astfel, numai 7000 de specii au fost domesticite până în prezent din numărul inițial de cca 300.000 de specii vasculare, fiind cultivate de oameni de-a lungul mileniilor în diferite scopuri. Asigurarea alimentară pentru hrană este oferită de 30 de specii de plante, care asigură 98% din necesitățile nutritive. Anual apare un număr redus de varietăți noi, de plante cultivate, care pot fi utilizate în asigurarea securității

alimentare. Pentru necesitățile populației, reprezentată de peste șapte miliarde de oameni și mai ales pentru cele 9-10 miliarde care sunt estimate pentru anii 2050, resursele alimentare trebuie să crească semnificativ. Una din soluțiile pentru asigurarea acestui obiectiv este creșterea substanțială a potențialului de producție a culturilor nou create pentru atingerea performanțelor de înalt nivel. Un rol important o are valoarea materialului genetic ce trebuie utilizat și eficientizarea metodelor și tehnicilor de lucru în activitatea de ameliorare [122].

Interesul pentru stabilitatea producției agricole și a siguranței alimentare, a încurajat conservarea și utilizarea resurselor genetice vegetale, constituind în același timp sursa schimbărilor dramatice în cercetarea agricolă, mai ales în domeniile geneticii, fiziologiei, fitopatologei și biochimiei [74; 236].

Diversitatea genetică devine mai importantă în contextul schimbărilor climaterice, deoarece poate servi drept sursă pentru multe caractere noi care conferă rezistență la stresurile biotice și abiotice. Variabilitatea genetică este baza heterozisului și segregării transgresive. Progresele recente în biotehnologie se datorează tehnicilor care pot fi utile activității amelioratorilor de plante, pentru a îmbunătăți calitatea soiurilor și, de asemenea să genereze o nouă variabilitate genetică. Pentru a elimina dezavantajele soiurilor comerciale și dezvoltarea de genotipuri noi, devin necesare crearea liniilor performante, extinderea diversității și utilizarea ulterioară a acesteia. Mai mulți autori s-au axat pe aspecte vitale, cum ar fi schimbările în diversitatea genetică în cadrul ameliorării plantelor [122], vulnerabilitatea genetică a soiurilor moderne de cultură [179], conservarea și utilizarea resurselor genetice [236; 276], evaluarea diversității genetice, folosind marcheri moleculari [223] și estimarea diversității genetice prin instrumente statistice [57].

Termenul „variabilitate” se referă la schimbarea unuia sau mai multor însușiri morfologice, fiziologice, biochimice, ecologice ale organismelor vii sub acțiunea mediului și a factorilor genetici [74]. Procese precum mutația, încrucișarea aleatoare, fertilizarea și duplicarea genelor pot introduce noi gene și alele, crescând astfel variabilitatea genetică. Mutațiile aleatoare pot fi ereditare sau neereditare, mutaţiile ereditare benefice exercitând o influenţă mare asupra variaţiilor genetice ale organismelor vii. De asemenea, fluxul de gene este un mijloc de a introduce noi alele într-o populație și, prin urmare, de a lărgi diversitatea genetică a organismelor vii. Variabilitatea genetică oferă linia de bază pentru diversitatea genetică, un termen mai larg care reflectă gradul/cantitatea de variație existentă în cadrul unei populații [66]. Populațiile existente dețin un potențial limitat de adaptarela condițiile climatice variate și sunt predispuse la degradare sau chiar la dispariție, ceea ce argumentează rolul variabilității genetice drept sursă de selecție naturală, în evoluția organismelor vii [20].

Diversitatea genetică a culturilor este elementul de bază al ecosistemului agroclimatic inteligent pentru a asigura disponibilitatea alimentară durabilă și, prin urmare, pentru a atenua foamea și sărăcia [66; 133]. În acest context, noi surse de alele dorite sunt exploatate din speciile sălbatice, precum și din speciile de culturi și mutanții strâns înrudite. Prin urmare, pentru obiectivele de reproducere în continuă schimbare, este imperativ de a conserva materialul biologic ca sursă de germoplasmă [20].

Agricultura a progresat odată cu perfecționarea metodelor de ameliorare a plantelor, și introducerea soiurilor moderne, care treptat au luat locul populațiilor locale [122]. Acest fenomen a condus la stocarea *ex situ* a vechilor culturi, formându-se colecții valoroase de germoplasmă. Materialul semincer conservat în Băncile de gene deține date despre caracteristica morfologică, fiziologică, biochimică și moleculară, ceea ce permite de a oferi cercetătorilor un material inițial de ameliorare cu însușiri bine cunoscute, având ca rezultat obținerea de soiuri moderne de calitate superioară și rezistență sporită la factorii de stres biotic și abiotic [66; 74].

Metode de evaluare a diversităţii genetice a plantelor de cultură. Diversitatea genetică a plantelor rezultă din variațiile secvențelor de nucleotide a ADN-ului la specii. O mică parte a secvențelor de nucleotide se poate schimba datorită unor mutații care pot fi observate în variația proteinelor și în polimorfismul marcherilor, variația caracterelor morfologice, fiziologice și a caracterelor agronomice îmbunătățite în soiurile noi create [74; 143]. Evaluarea și distribuția divergenței genetice reprezintă linia de bază a conservării și exploatării variabilității genetice în interiorul și între speciile de cultură [79]. Inițial, mai frecvent au fost marcheri morfometrici, citologici și biochimici utilizați pentru a evalua amploarea asemănărilor și diferențelor dintre germoplasma culturilor. Marcherii genetici și moleculari au fost dezvoltați în era genomică și post-genomică și acum sunt utilizați pentru estimarea variabilității genetice a culturilor [74; 223].

Marcherii morfologici se bazează pe evaluarea fenotipului, care este rezultatul interacțiunilor genotipului cu mediul, și poate fi modificat în anumite proporții de diferiți factori de mediu. S-a constatat că variația genetică contribuie semnificativ la variația fenotipică și produce doua tipuri principale de caractere: caractere cantitative și caractere calitative.

Evaluarea trăsăturilor fenotipice a plantelor cultivate în seră sau câmp a fost folosită de multă vreme pentru selecția diferitelor plante de cultură [36]. Caracterizarea morfometrică eficientă implică plantarea în câmp a unui număr mare de plante după un design specific de aranjament. Trăsăturile morfologice sunt înregistrate la creșterea vegetativă (procent de germinație, numărul de frunze, noduri, indicele suprafeței frunzelor, culoarea frunzei, grosimea tulpinii etc.), creșterea reproductivă (zile până la înflorire, zile până la maturitate, culoarea florii, morfologie etc.) și stadiul de maturitate (înălțimea plantei, randament, biomasă uscată și greutate

boabe etc.) [161]. Caracterizarea fenotipică este esențială în *screeningul* plantelor tolerante la stres. Caracterizarea morfofiziologică dependentă de stadiul de creștere oferă o linie de bază pentru amelioratori pentru a dezvolta diverse genotipuri cu atribute tolerante la stres [143]. În plus, datele fenotipice de bună calitate stau la baza noilor abordări genomice și moleculare pentru asigurarea bazei moleculare a trăsăturilor cantitative complexe, cum ar fi randamentul, rezistența la boli etc. [104]. Marcherii morfologici au o limitare a expresiei întârziate până la stadiul specific de dezvoltare al plantei. Mai mult, interacțiunile genotip x mediu, precum și alți factori, de exemplu infecțiile virale, fac marcherii morfologici mai puțin eficienți decât alte tipuri de marcheri. Cercetările efectuate la orz, au demonstrat influența virusului mozaicului dungat al orzului (VMDO) asupra manifestării caracterelor cantitative (talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, numărul de boabe/spic şi fraţi fertili/plantă, numărul internodurilor). S-a constatat VMDO induce repercusiuni cu o putere maximală în prima generaţie pentru talia plantei, lungimea ultimului internod, păstrând o amplitudine de variație majoră și în generația a treia și reprezintă pentru orzul de primăvară o sursă semnificativă de variație [16].

Marcherii citologici sunt utilizați pentru evaluarea resurselor genetice vegetale pe baza numărului și morfologiei cromozomilor plantelor [192]. Marcherii citologici permit descrierea cariotipului prin bandări cromozomiale și includ repetări, deleții, translocări, inversiuni. Acești marcheri sunt legați de variațiile morfologice ale mărimii cromozomilor, formei, numărului, lungimii, raportului brațelor, volumului, comportamentului în diviziunile celulare și conținutul de ADN etc. [176; 246]. Modelele de benzi G, Q, R și C ale cromozomilor indică regiuni ale cromatinei care sunt colorate cu ajutorul diferiților coloranți fluorescenți, precum clorhidratul de quinacrină (benzi Q) și colorația Giemsa (benzi G) [229]. Prezența sau absența unei benzi cromozomiale este asociată cu trăsăturile specifice. Acestea sunt folosite pentru a detecta mutațiile citologice și urmări aranjamentele cromozomiale evolutive [31]. Progrese au fost obținute prin îmbinarea hărților citologice și moleculare și introducerea metodei hibridizării fluorescente *in situ* (FISH), ce asigură cartografierea conținutului nuclear direct pe cromozomi și identificarea conținutului de proteine al unei celule. O variantă mai avansată de hibridizare *in situ* este „hibridizarea genomului *in situ* (Genomic *in situ* hybridization) - GISH”, ce utilizează ADN-ul genomic total al plantei ca sondă. Atât GISH, cât și FISH sunt instrumente puternice pentru a caracteriza introgresiunile la speciile de culturi și pentru a diseca structura genetică a hibrizilor naturali și artificiali [168]. Cu toate acestea, marcherii citologici au o utilizare limitată în estimarea diversității genetice datorită numărului lor limitat și tehnicilor laborioase.

Marcherii biochimici au fost printre cei mai folosiți marcheri pentru evaluarea variațiilor între și în cadrul speciilor de cultură înainte de apariția marcherilor moleculari/ADN. Formele alternative de proteine (izozime) prezintă modele specifice de bandă pe electroforeza în gel, datorită variațiilor în mobilitatea proteinelor bazate pe sarcină [156]. Izozimele sunt produse ale diferitelor alele, poziția lor poate fi mapată pe cromozomi și, prin urmare, pot fi utilizate pentru cartarea unor gene. Analiza proteinelor/izozimelor este încă printre metodele simple, rapide și ieftine și se potrivește bine în proiectele în care se dorește un nivel scăzut de estimare a diversității genetice. Deși marcherii proteici sunt mai fiabili decât marcherii morfologici, expresia lor depinde de stadiul de creștere a plantelor și este ușor influențată de mediu [73; 141]. Au fost evidențiate posibilităţile metodologice ale marcherilor proteici în identificarea efectului direct şi pleiotropic al genelor *o_2*, *su_2* şi *wx_1*, al dozelor acestor gene, precum şi depistarea rolului genomului formei materne în expresia genelor respective la combinaţiile hibride de porumb *Zea mays* L. [21].

Un instrument în studierea diversităţii genetice intraspecifice este selecţia asistată de marcheri moleculari, ce presupune evidențierea indivizilor ce prezintă regiuni implicate în expresia însușirilor de interes, prin urmare îmbunătăţirea calităţii culturilor, cu utilizarea marcherilor genetici. Identificarea şi descifrarea structurii diferitelor gene prin metodele biologiei moleculare, a dus la stabilirea unor corelaţii între genotipuri şi anumite caractere calitative şi cantitative ale indivizilor studiaţi, însuşiri de reproducţie şi de rezistenţă la boli şi dăunători [12; 223].

Marcherii moleculari, bazați pe polimorfismul ADN-ului, sunt cei mai utilizați în principal datorită abundenței lor [145; 229]. Aceștia asigură eficacitatea metodei pentru evaluarea variațiilor genetice a culturilor datorită moștenirii lor simple, reproductibilității ridicate, distribuției pe scară largă în genomul plantelor, fiind stabile, polimorfe, cu efecte pleiotrope minime [256]. În ameliorarea culturilor, marcherii moleculari ajută la identificarea/selectarea timpurie a genotipurilor dorite, reducând astfel timpul de dezvoltare a soiului și posibilitatea amelioratorilor de a reproducere anumite forme de interes [37; 38; 49; 85].

Marcherii moleculari apar din diferite clase de mutații ADN, cum ar fi mutații de substituție (mutații punctuale), rearanjamente (inserții sau deleții) sau erori în replicarea ADN-ului repetat în tandem [251; 296]. Acești marcheri sunt selectiv neutri, deoarece sunt de obicei localizați în regiunile necodificatoare ale ADN-ului. Spre deosebire de alții, marcherii ADN sunt nelimitați ca număr și nu sunt afectați de factorii de mediu și/sau de stadiile de dezvoltare ale plantei. Marcherii ADN au numeroase aplicații în ameliorarea plantelor, cum ar fi evaluarea asistată de marcheri a materialului de ameliorare, evaluarea nivelului diversității genetice,

selecția parentală și evaluarea purității materialului genetic [37; 38; 124; 147; 335], studiul heterozisului și identificarea soiurilor, regiunilor genomice implicate în backcrossing, selecția asistată de marcheri [85]. Marcherii moleculari pot fi împărțiți în trei clase în funcție de metoda de detectare a acestora: bazată pe hibridizare, bazată pe reacția de polimerizare în lanț (PCR) sau pe secvențe ADN.

Polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție (RFLP) sunt marcheri bazați pe hibridizare dezvoltați mai întâi în studiul genetic la om în anii 1980 [72] și mai târziu utilizați și în cercetarea plantelor [334]. RFLP se bazează pe variația (variațiile) în lungimea fragmentelor de ADN produse de o asimilare a ADN-urilor genomice și compară hibridizarea cu marcheri specifici a doi sau mai mulți indivizi ai unei specii. RFLP-urile au fost utilizate pe scară largă pentru a compara genomurile din marile familii de cereale, cum ar fi secară, grâu, porumb, sorg, orz și orez [64]. Avantajele RFLP includ detectarea unui număr nelimitat de loci fiind codominant, iar rezultatele sunt transferabile între populații. Cu toate acestea, RFLP-urile sunt foarte costisitoare, consumatoare de timp, necesită multă muncă, sunt necesare cantități mai mari de ADN, prezentat un polimorfism limitat în special între liniile înrudite [85].

În prezent, sistemele de marcheri bazate pe reacția de polimerizare în lanț (PCR) sunt mai rapide și necesită mai puțin material vegetal pentru extracția ADN-ului. ADN-urile polimorfe amplificate aleatoriu (RAPD) au fost primii marcheri bazați pe PCR și sunt produși folosind ADN-ul genomic și primeri arbitrari (aleatorii) scurți și ulterior clonat în multiple copii de ADN [14; 164; 336]. Avantajele RAPD sunt reprezentate prin rapiditate, simplitate și cost redus, posibilitate de descriere a mai mulți loci cu un singur primer și e necesară o cantitate mică de ADN [131; 207]. Cu toate acestea, rezultatele RAPD nu pot fi reproduse și pot detecta doar trăsăturile dominante.

Polimorfismele cu lungimea fragmentelor amplificate (AFLP) combină atât PCR, cât și RFLP. AFLP este generat prin asimilarea fragmentelor amplificate prin PCR folosind enzime de restricție specifice care taie ADN-ul la sau în apropierea locului de recunoaștere specifică din secvențele de nucleotide. AFLP-urile sunt foarte reproductibile și acest lucru permite generarea rapidă și frecvența ridicată a AFLP-urilor identificabile, făcându-l o tehnică atractivă pentru identificarea polimorfismelor și pentru determinarea legăturilor prin analiza indivizilor dintr-o populație segregată [199; 221].

O altă clasă de marcheri moleculari care depinde de disponibilitatea secvențelor scurte de oligonucleotide repetate în genomul plantelor, cum ar fi SSR, STS, SCAR, EST-SSR și SNP [124]. Analiza genotipării prin repetiții de secvență scurtă prin utilizarea a 52 de marcheri SSR a

orzului sălbatic, a demonstrat că din 206 alele, aproximativ 111 s-au dovedit a fi comune și 24 de alele unice [145]. Mulți autori au revizuit în detaliu diferite tehnici de marcheri [223; 255; 293].

Astfel, studierea şi evaluarea diversităţii genetice, exclusiv prin metode moleculare facilitează identificarea în cadrul populaţiilor a indivizilor cu genotipuri dorite la nivelul locilor genelor ce codifică caracterele de interes, realizându-se în acest mod o selecţie sigură, rapidă şi eficientă în cadrul populaţiilor studiate. Tehnicile moleculare utilizate în evidenţierea variabilităţii genetice oferă perspective promiţătoare pentru avansarea cunoştinţelor în domeniul biologiei vegetale şi marchează un salt calitativ asigurat de perfecţionarea metodelor de investigare, cristalizându-se aspectul molecular al fiziologiei plantelor şi al ştiinţelor agricole în general [12; 141; 145].

1.2. Triticalele – aspecte genetice și ameliorative

Odată cu creșterea exponențială a populației umane pe glob și cu limitarea suprafețelor agricole cultivabile, constant se majorează necesitatea culturilor alimentare, în principal a cerealelor, iar securitatea alimentară devine tot mai amenințată și vulnerabilă. Până la momentul actual cerealele rămân o sursă importantă de nutrienți pentru oameni și animale și furnizarea suficientă de cereale pentru populația umană este o prioritate pentru următoarele decenii. Deși extinderea suprafețelor de cultivare la nivel mondial și plantarea celor mai populare cereale pot crește randamentul anual, crearea noilor culturi, soiuri, linii cu productivitate și rezistență ridicată a constituit o preocupare permanentă pentru cercetătorii din domeniul agriculturii.

Încă la sfârșitul secolului al XIX-lea în laboratoarele din Scoția (Wilson S, [337]) și Germania, de Wilhelm Rimpau, 1888 a fost creat un hibrid de grâu (*Triticum*) și secară (*Secale*), numit Triticale (*Triticosecale*) [citat după 309], care îmbina productivitatea grâului cu rezistența secarei [208]. Această cultură a fost dezvoltată în primul rând ca cereală furajeră pentru animale, datorită versatilității sale scăzute pentru piața alimentară umană în comparație cu alte cereale convenționale, cum ar fi grâul. Culturile tradiționale de cereale precum grâul, secara, orzul, ovăzul și porumbul s-au format ca urmare a selecției evolutive de milenii. Triticalele au apărut cu mult mai târziu, fiind cea mai tânără cultură de cereale și primul graminoid sintetizat de oameni [198]. Triticale (× *Triticosecale* Witt.) este o specie, deosebit de importantă din punctul de vedere al agricultorilor, care reprezintă un organism alopoliploid derivat din dublarea cromozomală a hibrizilor dintre două genuri: *Triticum* și *Secale*.

Comparativ cu „regele” cerealelor - grâul comun - triticalele are un șir de priorități – productivitate înaltă, conținut însemnat de proteină în boabe cu aminoacizi esențiali, rezistență

la iernare, secetă și maladii, toleranță la toxicitatea sărurilor, insensibilitate la lungimea zilei (fotoperioadă), posibilitate de utilizare complexă atât pentru furaj, cât și în alimentație (panificație, patiserie, producerea alcoolului și a berii), de asemenea nu este pretențioasă față de sol, se obțin recolte mari pe povârnișuri, soluri argiloase, nisipoase cu agrofond sărac [185]. Această plantă cerealieră prezintă toleranţă la toxicitatea ionilor de aluminiu, ce determină cultura să poată fi amplasată pe solurile acide, nemaifiind necesară amendarea cu calcar a acestora.

Totodată triticale are un randament rapid de creștere: încolțirea semințelor este mult mai bună, dezvoltarea se petrece într-un ritm alert, cu o acoperire completă a terenului, în comparație cu celelalte cereale, ceea ce asigură combaterea buruienile prin lipsirea lor de lumină. Din acest motiv erbicidarea nu este obligatorie, obținându-se produse ecologice, acest fapt fiind încă un avantaj pentru cei care cultivă triticale [26; 234].

Interesul sporit față de triticale este condiționat de valoarea nutritivă a culturii menționate, care este atrăgătoare, în cea mai mare parte, de conţinutul sporit de substanţe proteice, care depăşeşte pe cel al grâului, precum şi de structura de aminoacizi ai complexului de proteine şi îndeosebi de conţinutul mai bogat în lizină. Valoarea nutritivă, digestibilitatea ridicată a carbohidraţilor şi a proteinelor conferă prioritate triticalelor îndeosebi în furajarea animalelor nerumegătoare, a porcilor şi a păsărilor. Cercetările efectuate în această privinţă au demonstrat că raportul proteină – energie este în general mai mare în cazul nutreţurilor obţinute din triticale, decât a concentratelor tradiţionale [216].

Glutenul este principala proteină de depozitare a boabelor de grâu și are o influență primordială asupra rezistenței, elasticității, vâscozității și coeziunii aluatului. Gluteninele cu greutate moleculară mare (HMW) au o influență substanțială asupra calității pâinii, în ciuda faptului că reprezintă <10% din proteinele totale din boabe. Numeroase cercetări evidențiază potențialul triticalelor ca cereale cu randament ridicat pentru consumul uman, dar lipsa unei creșteri extensive a suprafețelor cultivate de triticale și a selecției pentru păstrarea calității proteinelor a reprezentat un obstacol major în calea utilizării acestora în panificația comercială [208].

Genomul triticalelor hexaploide (AABBRR) codifică trei subunități ale proteinei de rezervă cu masă moleculară mare 75K γ-secalina și alte proteine de stocare cu greutate moleculară mai mică [156]. Secaloglutenina este un alt nume pentru proteinele polimerice de rezervă ale triticalelor, constând din glutenin, secalină, glutenină și 75 Kγ-secalină [89].

Lizina este un aminoacid limitativ în boabele de cereale, dar s-a descoperit că unele genotipuri de triticale au niveluri de lizină mult mai mari decât la grâu sau secară [310]. Acest

lucru face din triticale o sursă bogată în lizină pentru nutriția umană. Datorită nivelului ridicat al acestui aminoacid, valoarea biologică a proteinei de triticale s-a dovedit a fi mai mare decât cea a proteinei de grâu. Conținutul brut de proteină al boabelor de triticale este variabil, 90 – 200 g/kg de substanță uscată [70].

Endospermul este țesutul trofic al bobului bogat în carbohidrați. Principala formă de carbohidrați este amidonul, care este aranjat fie în granule A lenticulare mari, fie în granule B mai mici, sferice, legate de proteine și lipide. Granulele A și B au proprietăți fizice și chimice diferite, cum ar fi gelatinizarea, temperatura de lipire, vâscozitatea și retrogradarea [300].

Polizaharidele solubile non-amidon, fibrele dietetice bine cunoscute, au devenit un subiect major în știința nutrițională modernă [208]. Fibrele alimentare sunt foarte vâscoase și pot fi scindate în lanțuri mai scurte de acizi grași. Se presupune că acestea pot contribui la prevenirea bolilor coronariene, cancerului, creșterii colesterolului și a bolilor intestinale [188]. Cantitatea fibrelor în boabele de triticale este mult mai mare în comparație cu grâul și secară [270].

Cercetările efectuate în IGFPP demonstrează, că în medie 14,8% din complexul chimic al bobului de triticale revine substanţelor proteice. Analizele efectuate asupra calităţii proteinelor din făina de triticale au demonstrat că proteinele de rezervă se caracterizează printr-un conţinut destul de ridicat în glutamină (peste 32%) şi în prolină (peste 12,5%), şi în acelaşi timp, prin cantităţi sporite și printr-un coraport bine balansat de aminoacizi esenţiali: lizină, metionină, triptofan, izoleucină, leucină, valină, fenilalanină, treonină şi alte. Sub acest aspect, proteinele de triticale prezintă o valoare biologică mai mare decât proteinele altor cereale [26].

Conţinutul de substanţe proteice oscilează în limite largi, înregistrând valori mai ridicate în condiţiile de cultură şi fertilizare cu doze sporite de azot. Asupra compoziţiei chimice a bobului de triticale influenţează gradul de umplere şi mărimea bobului. În boabele şiştăvite şi incomplet formate conţinutul de proteine, grăsimi şisubstanţe minerale este mai mare, iar cel de carbohidraţi este mai mic decât în boabele normal dezvoltate. O altă categorie de substanţe, care se întâlnesc în boabele de triticale sunt vitaminele - E, B1, B2, precum şi provitamina A. De asemenea, se poate semnala prezenţa vitaminei C în anumite faze ale vegetaţiei plantelor şi îndeosebi în fazele de maturizare în lapte şi ceară a bobului [26].

Triticalele au o importanță economică deosebită pentru omenire în prezent, fiind utilizate atât în alimentație umană, cât și pentru hrana animalelor și producția de biocombustibil. De asemenea, această plantă este relevantă pentru controlul eroziunii solului și ca cultură de acoperire [199]. Datorită spectrului larg de utilizare a acestei culturi, este extrem de importantă îmbunătățirea constantă a formelor existente sau crearea de noi soiuri. Cu toate

acestea, trebuie remarcat faptul că genotipurile de plante stabile, cu o gamă largă de abilități de adaptare în ceea ce privește caracterele utile, joacă un rol semnificativ pentru ameliorarea modernă a plantelor. Pe de altă parte, triticalele se caracterizează printr-o asemănare genetică mare, ceea ce nu este un fenomen favorabil pentru reproducerea de noi soiuri. Este important ca materialul de reproducere să fie divers din punct de vedere genetic [185].

Majoritatea programelor de reproducere a triticalelor se concentrează asupra îmbunătățirii caracterelor importante din punct de vedere economic, cum ar fi bio-randamentul, rezistența la boli și dăunători, calitatea ridicată a boabelor. Mai multe studii au demonstrat că diversitatea genetică în cadrul germoplasmei triticalelor este scăzută, fapt ce este predictibil, având în vedere durata scurtă de viață a acestei culturi de la crearea ei.

Germoplasma de triticale posedă un nivel ridicat de rezistență la boli și dăunători în comparație cu grâul; cu toate acestea, odată cu apariția de noi rase în populațiile de patogeni și insecte, germoplasma actuală de triticale poate deveni vulnerabilă la multe boli și dăunători [44; 45; 215; 216]. Rugina tulpinii, cauzată de *Puccinia graminis f.* sp. *tritici*, a fost raportată ca fiind prima maladie a triticalelor care a apărut în proporții epidemice în Australia [46]. Alte ciuperci biotrofe patogene (*Puccinia* sp., *Septoria complex, Ustilago* sp. și *Urocystis* sp.), făinarea (*Blumeria graminis*), crusta (*Fusarium* sp.), putregaiul rădăcinii (*Bipolaris sorokiniana*), cornul de ergot (*Cleviceps purpurea*), nematoda cerealelor (*Heteroderma avenae*), musca Hessiană (*Mayetiola destructor*) și bolile bacteriene cauzate în principal de *Xanthomonas* și *Pseudomonas* sp., afectând în special culturile de grâu și secară, devin factorii biotici majori care limitează creșterea producției de triticale [44; 45; 215; 216; 273; 289; 290]. În plus, stresul abiotic (aciditatea sau alcalinitatea extremă a solului, deficiența micronutrienților, toxicitatea, seceta și temperaturile excesive) este considerat un factor care, de asemenea, reduce semnificativ producția de triticale [215].

Fiind o cultură relativ nouă sintetizată de către om, germoplasma de triticale a fost folosită pentru reproducere începând cu anii 60 ai secolului XX (CIMMYT - Centrul Internațional de Ameliorare a Porumbului și Grâului din Mexico) [130; 183; 216]. În prezent există patru tipuri diferite de triticale utilizate în programele de ameliorare: *triticale primare* (obținute prin încrucișarea grâului cu secara), *triticale secundare* (obținute prin încrucișarea diferitelor soiuri de triticale), *triticale complet*e (conținând toate cele 7 perechi cromozomi de secară) și *triticale substituite* (unul sau mai mulți cromozomi de secară sunt înlocuiți cu cromozomi de grâu) [183].

Amelioratorii de triticale se confruntă cu multe provocări pentru a dezvolta și îmbunătăți triticalele primare. Aceste provocări includ, în principal, sterilitatea parțială a inflorescențelor,

performanța agromorfologică redusă, randamentul scăzut, caracteristicile de calitate și adaptare slabe, și, nu în ultimul rând, boabele zbârcite (cauzele care conduc la formarea boabelor zbârcite fiind condiţionate genetic). Pentru a depăși aceste provocări și a îmbunătăți caracteristicile culturii, amelioratorii au început să încrucișeze diferite triticale primare între ele, cât și cu grâul. Produsele acestor abordări sunt triticale cu noi combinații de cromozomi de grâu și secară – triticale secundare [215; 273].

Evaluarea dinamică a germoplasmei de triticale din țările americane și europene a demonstrat că nu există nici o diversitate în funcție de originea geografică, dar există doar două tipuri majore: de iarnă și de primăvară. Cu toate acestea, în ultimii ani au fost dezvoltate mai multe programe de ameliorare a triticalelor, în special la Centrul Internațional de Ameliorare a Porumbului și Grâului din Mexico (CIMMYT), pentru a elabora noi soiuri pentru alimentarea umană, pentru furaje și cu destinație mixtă. Un alt studiu, în care au fost evaluate peste 3000 de genotipuri de triticale originare din America de Nord, a relevat că diversitatea genetică este relativ scăzută, iar unele diferențe au fost observate doar între triticale de tip complet și cel substituit [123]. Studiile recente efectuate folosind marcheri moleculari au demonstrat, de asemenea, o diversitate genetică scăzută printre germoplasmele de triticale [234]. Cu toate acestea, studiile diversității genetice a germoplasmei triticalelor sunt bazate pe utilizarea diferitor marcheri, iar cu polimorfismele uninucleotidice (SNP) încă lipsesc. Rapoartele anterioare din literatură indică faptul că pentru a estima variația genetică la triticale pe larg au fost utilizați marcherii morfologici [123].

Selecția genomică și cea asistată de marcheri (MAS) sunt de rutină pentru îmbunătățirea multor culturi de cereale, cum ar fi grâul și orzul. Cu toate acestea, studiile au arătat că selecția genomică a triticalelor nu a fost studiată pe scară largă [216]. Identificarea marcherilor legați de trăsăturile economice și utilizarea lor în programele de ameliorare va spori fără îndoială îmbunătățirea triticalelor și, prin urmare, cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe exploatarea germoplasmei și studii genetice.

Deși triticalele sunt autogame, poate fi înregistrată polenizarea încrucișată parțială datorită prezenței genomului de secară, fenomen utilizat în obținerea spontană a hibrizilor de triticale. Producția preliminară de hibrizi a demonstrat rezultate promițătoare, heterozisul fiind observat în 10-20% cazuri. Cu toate acestea, lipsa diversității genetice a triticalelor este un impediment al eficienței hibridărilor și stabilirii heterozisului [234].

În ameliorarea modernă, este extrem de importantă selecția corectă a triticalelor, folosind fenomenul heterozis şi elaborarea metodelor de obţinere a seminţei hibride pentru a crea hibrizi productivi, caracterizați prin calitate înaltă a boabelor. Se știe că încrucișarea formelor distante

genetic, comparativ cu cele strâns înrudite, este mai benefică pentru crearea de hibrizi heterozici [24; 241]. Prin urmare, este important să analizăm legăturile genetice dintre soiurile de triticale cultivate în mod constant, astfel încât acestea să poată deveni o sursă de gene pentru soiuri noi.

Toți hibrizii de triticale sunt alopoliploizi/amfipoliploizi, ceea ce înseamnă că cromozomii lor sunt derivați din taxoni diferiți. De-a lungul timpului au fost create și evaluate diverse tipuri de triticale cu diferite niveluri de ploidie (tetraploide, hexaploide, octoploide și decaploide) după numărul de cromozomi. Dintre triticale cu diferite niveluri de ploidie, majoritatea soiurilor sunt hexaploide. Deși triticalele octaploide prezintă caracteristici de calitate mai bune în comparație cu triticalele hexaploide, acestea suferă de instabilitate genetică și sterilitate a inflorescențelor, ca și cele tetraploide [215]. Formele hexaploide conțin 42 de cromozomi: 28 de la grâu și 14 de la secară (*Secale cereale* L.). Formele sintetice primare de triticale conțin genomul A și B de grâu dur (*Triticum durum* Desf.) sau al altor specii tetraploide; la soiurile contemporane, clasificate ca triticale secundare, majoritatea cromozomilor de grâu au fost introgresați din grâul comun hexaploid (*T. aestivum* L.) [174].

Au fost propuse mai multe strategii pentru a dezvolta variabilitatea genetică care ar permite amelioratorilor să transforme triticalele într-o cultură mai competitivă. Au fost descrise scheme sistematice la nivel mondial pentru programele de ameliorare a triticalelor, axate pe crearea noilor resurse genetice, precum și pe mărirea variabilității genetice [214]. Obiectivele majore de ameliorare pentru îmbunătățirea triticalelor includ creșterea randamentului de cereale și de biomasă, înălțimea mai mică a plantei, dimensiunea redusă a aristelor, rezistența sporită a paielor, maturitatea timpurie, greutatea crescută și umplerea boabelor, nutrienții îmbunătățiți, toleranța/rezistența la diverse stresuri abiotice (în special hidric) și biotice cum ar fi ergotul (cornul secarei), fuzarioza, petele frunzelor [215].

Diversitatea genetică în cadrul germoplasmei triticalelor este relativ redusă în comparație cu alte culturi de cereale, cum ar fi grâul și orezul. Prin urmare, reproducerea ar trebui să se concentreze pe crearea variabilității genetice în cadrul fondului genetic disponibil și pe utilizarea abordărilor de reproducere moleculară pentru a îmbunătăți această cultură promițătoare [214]. Deși abordările de ameliorare bazate pe selecția asistată de marcheri și recent selecția genomică, sunt cruciale în îmbunătățirea majorității speciilor de culturi, utilizarea lor la triticale este încă în stadii inițiale. În mod similar, tehnologiile moderne, cum ar fi CRISPER - CAS (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated System), utilizate în prezent pentru editarea genelor în multe culturi, trebuie să fie adoptate pentru îmbunătățirea triticalelor. Ingineria genetică și abordările de reproducere prin mutații s-

au dovedit, de asemenea, eficiente în îmbunătățirea speciilor de culturi, iar utilizarea lor în ameliorarea triticalelor poate ajuta la atingerea rapidă a obiectivelor propuse.

Pentru realizarea obiectivelor de ameliorare se folosesc tehnici moderne adecvate, atât pentru obţinerea de hibrizi, cât şi pentru selecţie, ca de exemplu:

1. cultura de embrioni pentru hibridările distante, care în mod obişnuit nu produc boabe;
2. cultura de ţesuturi, folosirea locusurilor mutante care controlează conjugarea cromozomilor, pentru a facilita transferul de gene între cromozomi neomologi;
3. metoda haploizilor dublaţi, folosind hibrizii „grâu x secară”;
4. metode de infecţie artificială pentru cei mai importanți patogeni, incluzând metoda “frunzelor detaşate” pentru septorioza, injectarea de inocul în florile mediane pentru *Fusarium* etc., în scopul selectării descendenţilor cu rezistență;
5. selecţia gametică prin reglare osmotică ridicată pe baza expresiei genelor de rezistență hidrică la nivel de grăunciori de polen etc. [24].

Strategia Europeană 2020 pentru creștere economică și competitivitate durabilă consideră triticalele ca un candidat promițător printre cereale pentru consumul alimentar uman, hrana animalelor, dar și producerea bioetanolului și biocombustibilului. În pofida numeroaselor avantaje ale triticalelor, producția mondială este încă pe departe de a fi satisfăcătoare cererilor de piață. În 2016 au fost cultivate circa 4,4 milioane ha de triticale; Polonia, Germania, Belarus, Franța, China și Federația Rusă au fost principalii producători (Tabelul 1.1; Figura 1.1).

Tabelul 1.1. Suprafața de triticale recoltată la nivel mondial și cantitatea de producție (FAO Stat 2016)

Țara	Suprafața cultivată, ha	Producție mil. t	Productivitatea, mil.t/ha
Polonia	1403519	5102445	3,64
Belarus	499568	1641215	3,29
Germania	396100	2397300	6,05
Franța	334220	1448116	4,33
China	238604	431089	1,81
Federația Rusă	223078	619202	2,78
Spania	203101	447278	2,20
Ungaria	139183	504810	3,63
Lituania	100367	329455	3,28
România	82566	287326	3,48

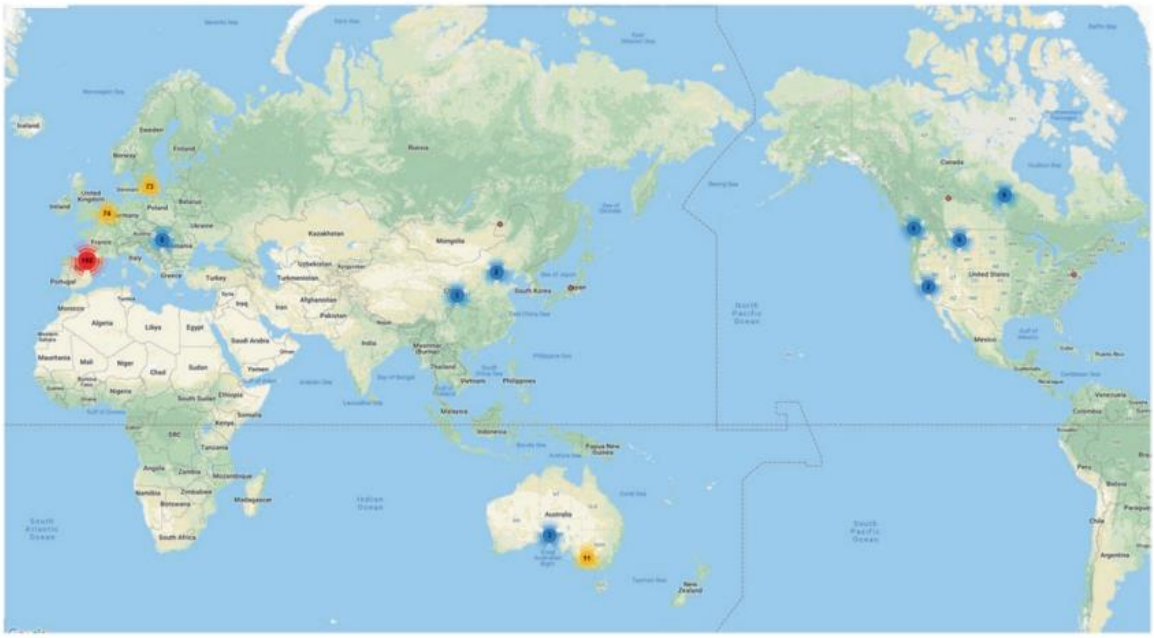


Figura 1.1. Harta zonelor de cultivare a triticalelor din lume (http://eol.org/).
Zonele de creștere înalte, medii și scăzute sunt afișate prin culorile roșu, galben și respectiv, albastru.

În Polonia, producția acestei cereale de-a lungul anilor a sporit constant, ajungând la 6,08 milioane tone în 2020. Germania și Belarus sunt, de asemenea, printre principalele țări europene ce cultivă triticale - aproximativ 3,5 milioane tone (FAO, 2020) [108].

Producția mondială de triticale s-a majorat treptat în ultimii ani, de la 6,4 milioane tone în 2006 la 15,4 milioane tone în 2020 (Tabelul 1.2; FAO, 2010 - 2020).

Tabelul 1.2. Producătorii de triticale în 2020
(Source: UNFood and Agriculture Organization) [108]

Top	Țările	Producția de triticale (mil. t)
1.	Polonia	6,08
2.	Germania	2,04
3.	Belarus	1,54
4.	Franța	1,20
5.	Spania	0,79
6.	Lituania	0,44
7.	China	0,41
8.	Austria	0,33
9.	Rusia	0,31
10.	Ungaria	0,30

În România au fost înregistrate până în prezent mai multe soiuri de triticale, iar odată cu introducerea în producere a soiurilor cu talia semipitică a plantei, precum Titan şi Trilstar (purtătoare a genei RHt1 transferată de la grâu), soiuri cu potenţial şi stabilitate ridicată a producţiei, extinderea suprafețelor de cultivare a triticalelor este în continuă creştere [18]. În România, la nivelul anului 2016, triticalele s-au cultivat pe circa 82600 ha cu tendinţa de

creştere a arealului de cultură. Aceste valori indică importanța economică ridicată a triticalelor, iar motivul este randamentul foarte înalt și combinația multor caractere benefice de la speciile parentale - grâu și secară [185].

Pentru zona pedoclimaterică a Republicii Moldova cele mai răspândite și mai productive tipuri de triticale sunt cele hexaploide. Pe parcursul a mai mult de 25 ani de cercetări științifice cu scopul de a crea forme primare și secundare de triticale, au fost studiate mai mult de 30.000 forme hexaploide de origine diferită evidențiate în generațiile $F_2 – F_7$.

Pe parcursul ultimilor ani, datorită lucrului productiv în direcția ameliorării, în cadrul IGFPP au fost studiate mai mult de 200 de genotipuri și soiuri de triticale, care concurează cu cele mai bune soiuri de grâu, secară și orz după trăsăturile valoroase din punct de vedere econimic. Astfel, dintre soiurile omologate putem menționa: Ingen 93, Ingen 33, Ingen 35, Ingen 40 și Ingen 54. La soiurile noi de triticale Ingen 35 și Ingen 40 sticlozitatea bobului a constituit 80 – 90%, proteina 14 – 15%, iar glutenul 21 – 24% [26].

Recolta medie pe republică în anul secetos 2015 la soiul Ingen 40 a fost de 6,21 t/ha, iar la soiul Ingen 93 - 6,49 t/ha. Astfel, Ingen 40 a demonstrat un surplus de recoltă – 1 t/ha în comparație cu grâul comun Moldova 11. În anul 2021 recolta pentru soiul standart Ingen 93, a constituit 7,92 t/ha. Productivitate ridicată au prezentat 41,7% din linii și a variat între 0,24 – 1,05 t/ha față de forma standard (Ingen 93) [372].

Datele prezentate atestă importanța problemelor genetice și ameliorative ale triticalelor, iar studiile dedicate evidențierii soiurilor competitive din punct de vedere economic sunt extrem de actuale și merită o atenție continuă.

1.3. Fenomenul inducerii *in vitro* a variabilității genetice la plante

Intensificarea agriculturii trasează sarcini dificile pentru amelioratori în crearea soiurilor noi, care se caracterizează prin randamente majorate, rezistență la maladii și dăunători, flexibilitate ridicată la factorii de stres ai mediului. Pentru a crea astfel de soiuri, sunt necesare noi cercetări științifice, care ar accelera și amplifica eficacitatea procesului de reproducere. Metodele biotehnologice au un nou instrument unic pentru extinderea variabilității genetice – variabilitatea somaclonală, bazată pe utilizarea țesuturilor și organelor vegetale cultivate *in vitro* [355]. Modificările genetice care apar în celulele cultivate *in vitro* și plantele regenerate din acestea fac posibilă îmbunătățirea soiurilor existente, iar cultivarea celulelor somatice *in vitro* extinde posibilitatea de a crește frecvența și spectrul mutațiilor. Variabilitatea somaclonală este o sursă de variații genetice utile și reprezintă o expresie fenotipică a instabilității genomului din

nucleu și organite, fapt ce oferă posibilități pentru selectarea unor noi forme de cultură *in vitro* a plantelor ce se caracterizează prin trăsături economice valoroase precum productivitatea crescută, conținutul ridicat de nutrienți și rezistența la factorii de stres [55; 354].

Abordările biotehnologice bazate pe posibilitățile de cultivare a celulelor vegetale în condiții *in vitro* oferă o noutate și un instrument de extindere a variabilității genetice, care face posibilă combinarea metodelor clasice și inovatoare în ameliorarea plantelor [266]. Odată cu dezvoltarea tehnicii de regenerare a plantelor din țesutul calusal, a devenit posibilă obținerea de noi forme care diferă de plantele originale. O astfel de diversitate între liniile celulare a fost numită „somaclonă", iar fenomenul a fost numit „variabilitate somaclonală" [191]. Până în prezent modificările *in vitro* descrise în diferite studii au fost testate pentru a evalua fidelitatea genetică a plantelor în raport cu planta originală și nu au avut ca obiectiv generarea de somaclone care să fie aplicate în îmbunătățirea genetică a culturilor [128; 266].

Orice celulă somatică, introdusă în cultura *in vitro*, datorită proceselor de variabilitate somaclonală, poate restabili la plantele regenerate tot polimorfismul genetic caracteristic unei anumite specii și chiar unui gen de plante. Acest lucru deschide oportunități largi pentru restabilirea polimorfismului natural pierdut în timpul evoluției plantelor și pentru conservarea acestuia în cultura celulară și tisulară *in vitro*. În același timp, variabilitatea somaclonală reprezintă o piedică serioasă în propagarea genotipurilor valoroase și păstrarea lor pe termen lung, atunci când este necesară obținerea identității complete a clonelor regenerate [370].

Variabilitatea somaclonală apare în timpul cultivării țesuturilor și organelor izolate în condiții *in vitro*, însă poate fi depistată și la regeneranți [370]. Principalele motive care condiționează variabilitatea somaclonală sunt eterogenitatea genetică a celulelor explantului primar, precum și variabilitatea genetică și epigenetică indusă de condițiile cultivării *in vitro* [172; 271; 370, 376]. Frecvența variabilității somaclonale este influențată de mulți factori: genotipul explantului primar, condițiile și durata cultivării, concentrația de săruri și reglatorii de creștere din compoziția mediilor nutritive [271].

Pe baza acumulării datelor în domeniul cercetărilor fundamentale și aplicative metodele biotehnologice s-au înscris în procedeele de ameliorare a diferitor specii de plante de cultură. Astfel, au fost selectate somaclone valoroase la multe specii de plante caracterizate prin evidențierea caracterelor agronomice. Analiza somaconelor (R_2 - R_7) de hrișcă a permis evidențierea a trei linii cu productivitatea 12,1 - 15,6 q/ha, care se deosebeau de soiul inițial prin conținutul înalt de proteină (14,8%), mărimea boabelor și alte caractere prețioase [354]. Somaclonele de grâu și sorg au fost utilizate pentru obținerea liniilor cu randament ridicat, conținut crescut de proteine și ulei, coacere precoce, rezistență sporită la boli [48; 205].

Variantele somaclonale ale trestiei de zahăr Co 94012 și VSI 434 au fost dezvoltate în India și au prezentat caracteristici dezirabile, cum ar fi randament ridicat, conținut înalt de zaharoză și rezistență moderată la putregaiul roșu [321].

Până în prezent, s-a dovedit că variantele somaclonale pot exista ca forme stabile genetic și pot moșteni anumite caractere [271; 370]. Deci, variabilitatea somaclonală poate fi considerată un instrument eficient pentru amelioratori, deoarece combinarea metodelor de cultivare *in vitro* cu cele clasice de ameliorare accelerează foarte mult procesul de creare a soiurilor noi de plante.

Variantele somaclonale diferă de prototip nu numai prin trăsăturile calitative monogenice, ci și prin trăsăturile cantitative poligenice, cum ar fi rata de creștere, productivitatea, toleranța la factorii de stres de mediu. Utilizarea variantelor somaclonale în reproducere accelerează procesul de creare a unui nou soi de 2 - 3 ori. Pot fi evidențiate somaclone în care sunt combinate caractere greu asociabile într-un singur genotip prin selecție tradițională, de exemplu, productivitatea, indicatorii biochimici înalți și rezistența la factorii de stres [115].

Actualmente la dispoziția cercetătorilor sunt mai multe instrumente pentru detectarea și caracterizarea variantelor somaclonale: diferențele dintre trăsăturile morfologice [232; 254], analiza citogenetică pentru determinarea variației numerice și structurale a cromozomilor [28; 82; 86], evaluarea biochimică [175], determinarea markerilor ADN moleculari [62; 253; 371] sau studierea diverselor combinații dintre factorii enumerați [91; 311].

Printre cele mai frecvente modificări ale caracteristicilor morfologice calitative se remarcă variații ale culorii și formei frunzelor, florilor, fructelor, semințelor sau tuberculilor, prezența unui strat de ceară sau pubescența frunzelor. Trăsăturile cantitative care variază la regeneranți includ înălțimea plantei, numărul și dimensiunea frunzelor și tulpinilor, numărul și greutatea semințelor sau fructelor etc. Analiza morfologică, a somaclonelor de grâu din 4 generații (R_0, R_1, R_2 și R_3) obținute din calus embriogen din pasajul al cincilea a demonstrat că, începând cu generația R_2 și R_3 plantele regenerante manifestau o creștere semnificativă a variabilității fenotipice cantitative (înălțimea plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe per spic, greutatea boabelor) și calitative (culoarea boabelor, forma și culoarea glumelor). Somaclonele R_3 a soiului Otan atestă variație semnificativă pentru caracterul *număr de boabe per spic* media constituind 45 față de soiul martor (19,2), iar pentru indicele *masa de boabe per spic* - 1,8g față de martor - 0,84g [353].

Somaclonele obținute din două soiuri de grâu moale de primăvară (Saratovskaya 29, Ershovskaya 32) s-au evidențiat prin productivitate și randament ridicat, calitatea boabelor și proprietățile reologice ale aluatului, 0,8 - 15,9% din somaclone au format un bob de calitate superioară comparativ cu soiul martor. În spectrul de gliadină al liniilor somaclonale ale soiului

Ershovskaya 32, au fost identificate două biotipuri noi cu o frecvență de apariție de 7,1 și 29,2 % [359].

La cultura de tutun (*Nicotiana tabacum*) au fost obținute somaclone valoroase cu creșterea lungimii, lățimii și numărului de frunze, ce pot contribui la o productivitate mai mare a culturii [291]. La tomate s-au obținut somaclone cu modificări ale numărului de fructe, adică o caracteristică agronomică de mare importanță pentru această cultură [36; 104].

Variabilitatea genetică care apare *in vitro* și se manifestă prin diverse modificări (frunze mai rotunde și mai groase, număr și dimensiuni mai mare de flori, frunze și lăstari, precum și o reducere a timpului de inducție a florilor), contribuie la apariția noilor caracteristici fenotipice și la lansarea de noi linii de plante ornamentale și medicinale, în special la genurile Chrysanthemum *(Dendranthema grandiflora*), Cereus și Caladiums (*Caladium* × *hortulanum* Birdsey) [78; 102].

Din 2000 de plante de ghimbir ((*Zingiber officinale* Rosc.) - o cultură importantă, utilizată ca condiment, apreciată pentru proprietățile aromatice și medicale) inoculate *in vitro* au fost selectate opt plante cu diferențe morfologice clare și stabile (înălțimea plantei, culoarea și forma frunzei), la care pe perioada de cultivare (până la 120 zile) nu au fost depistate careva boli. Descoperirile acestui studiu ar putea contribui la producerea comercială de rizomi și semințe fără boli, iar variantele somaclonale ar putea oferi resurse de germoplasmă utile pentru reproducerea ulterioară [149; 184; 347].

Prin micropropagare clonală, pot fi obținuți hibrizii valoroși de tomate. Acest lucru permite menținerea colecției de hibrizi de tomate cu apariția unui număr minim de plante anormale pentru o lungă perioadă de timp și contribuie la creșterea variabilității parametrilor morfologici: coacere precoce, creștere bine echilibrată, reducerea sensibilității la patogeni [373].

Un grad ridicat de variabilitate a plantelor regenerate pentru o serie de indicatori de importanță pentru reproducere a fost determinat la grâu [34], la porumb [356] și la orez [327; 345], mei [54], soia, rapiță, cartof [29] și alte culturi. În special, s-au obținut variante somaclonale de grâu, care se caracterizează prin randament ridicat, rezistență crescută la boli și coacere mai timpurie [48], rezistență la secetă [360; 361; 375], salinitate excesivă [34] și metale grele [374; 380].

La mei (*Eleusine coracana*) au fost obținute somaclone stabile genetic cu un conținut ridicat de zahăr, randament crescut de semințe și masă verde în combinație cu trecerea accelerată a principalelor faze de dezvoltare - perioada de vegetație a liniilor cu maturare timpurie (de la germinare până la recoltare) a fost cu 10-20 de zile mai scurtă decât la variantele inițiale [352].

Conținutul de amidon este unul dintre criteriile majore de calitate vizate de programele de creștere a cartofilor. Varianta somaclonală Ros 119 (una dintre 105 clone provenite din calus), după greutatea și conținutul de amidon al tuberculilor, a înregistrat un potențial de tuberizare mai mare (cu 42% și 61% în greutate proaspătă și, respectiv, uscată) decât linia maternă Lady Rosetta. În plus, această clonă a înregistrat creșteri de 10% și 75% ale conținutului de amidon pe baza greutății uscate și, respectiv, a conținutului mediu per plantă [29].

Brassica juncea este principala cultură de semințe oleaginoase din India, în particular din Madhya Pradesh, cultivată în special pentru conținutul scăzut de acid erucic. Analiza comparată a caracterelor morfofiziologice și profilului acizilor grași, atestă o scădere semnificativă (5,48% și 5,52%), până la dispariția completă a acidului erucic la cele 2 somaclonele obținute și liniile parentale (41,36%) [302].

Când o celulă este izolată din întregul organism și transferată în condiții artificiale de cultivare *in vitro*, influența sistemelor de reglare a țesuturilor și organismelor, care asigură stabilitatea genomului, este aproape complet eliminată. Dezactivarea tuturor acestor sisteme duce la o creștere a variabilității citogenetice a celulelor cultivate. Astfel, fără a introduce mutageni puternici în mediul nutritiv, ci doar prin transferarea celulelor în starea de cultură, se poate obține o gamă largă de variabilitate genetică [356].

Variabilitatea somaclonală este o sursă de variații genetice utile și, prin selecție deosebită, face posibilă alegerea materialului vegetal de cultură *in vitro* care în afară de caracterele valoroase din punct de vedere economic, productivitate crescută, manifestă și rezistență la diferiți agenți patogeni sau factori abiotici [115].

Bolile la plante cauzate de fitopatogeni provoacă pierderi pentru economia globală de peste 220 de miliarde de dolari anual (FAO, 2022) [111]. Programele de îmbunătățire genetică prevăd modalități de reducere a impactului cauzat de boli și dăunători asupra culturilor agricole prin dezvoltarea de soiuri rezistente sau tolerante. Au fost implementate noi somaclone din diferite culturi cu caracteristici utile pentru reproducere, precum rezistența la agenți patogeni, toleranța la stres abiotic și productivitate ridicată [47; 116; 217].

Plantele de tomate (*Solanum lysopersicum* L.) cu rezistență îmbunătățită la fuzarioază (*Fusarium oxysporum*) au fost obținute prin expunerea calusului la acid fusaric [295]. Somaclonele de cartof rezistente la blenă timpurie, cauzată de *Alternaria solani* și blenă târzie (*Phytophthora infestans*) au fost regenerate din protoplaști de cartofi (*S. tuberosum* L.) soiurile „Rssset Burbank” și „Bintje” [73].

Prin selecția regeneranților plantelor de garoafe (*Dianthus cayophyllus* L.) au fost obținute somaclone rezistente la filtratul de cultură de *Fusarium oxysporum f.* sp. *Dianthi* [322].

De asemenea, somaclonele din embrionii imaturi a două soiuri indiene de grâu de primăvară (HUW 206, HUW 234) în generația R_3 - R_4, s-au caracterizat prin randament înalt, coacere și maturitate timpurie, rezistență sporită la rugina frunzelor și *Fusarium* în comparație cu forma inițială, iar caracterele îmbunătățite au fost apreciate în generația R_5 [48]. Rezistența florii soarelui (*Helianthu sannuus* L.) la *Alternaria helinathi* a fost îmbunătățită prin expunerea culturilor de calus la filtratele *Alternaria* [275]. La ghimbir (*Zingiber officinale* Rosc.) s-au obținut mutanți rezistenți împotriva agentului patogen al ofilirii (*Fusarium oxysporum f.* sp. *zingiberi* Trujillo) prin selecția *in vitro* [67]. Bananul *(Musa paradisiaca)* este unul dintre cei mai cultivați pomi fructiferi din lume, dar și afectat de mulți patogeni. Pentru a obține soiuri din subgrupul *Cavendish* tolerant la *Fusarium oxysporum* f. sp.*cubense*, din rasa tropicală Foc-TR4 au fost identificate nouă variante somaclonale de bananieri rezistenți la *Fusarium* [116].

Obținerea de plante tolerante la stres este prima prioritate a agronomilor și cercetătorilor. În acest scop, dintre diferitele tehnici adaptate, selecția *in vitro* a plantelor pe bază de culturi de țesuturi este cea mai eficientă și rapidă practică. Plantele selectate pot prezenta stabilitate genetică, dar vor fi plante, celulele sau țesuturile căreia care au demonstrat toleranță la condițiile de stres [267]. Selecția variantelor somaclonale în condiții *in vitro*, urmată de identificarea acestora, includerea în procesul de ameliorare și evaluarea caracterelor în condiții *in vivo*, conduce la obținerea de noi soiuri cu un potențial agronomic mai ridicat. Pe baza variabilității somaclonale, s-au obținut forme rezistente la secetă, temperaturi scăzute și salinitate [260].

Au fost generate somaclone ale unor culturi care sunt baza în industria alimentară globală: grâu, orez, banan, cartof [296]. În culturile de grâu au fost generate somaclone cu toleranță crescută la acest factor abiotic [34; 173]. Alte somaclone de grâu au fost folosite în calitate de surse de alele pentru dezvoltarea de noi tulpini de somaclone cu o creștere mai mare a rădăcinilor și rezistenței la secetă [201].

Toleranța la frig a ananasului a fost dezvoltată prin selecția la rece *in vitro* a variațiilor somaclonale. A fost utilizată temperatură scăzută ca agent selectat, iar condiția extremă letală pentru culturile de ananas *in vitro* a fost 0^0C timp de 72 de ore. Linia tolerantă la frig a fost obținută prin trei selecții consecutive cu tratamente de șoc la rece a calusului embriogen de ananas. Rezistența la frig îmbunătățită semnificativ a fost reflectată de rata de supraviețuire mai mare, conținutul crescut de prolină în comparație cu aceleași calități la martor [346; 357].

Cercetările efectuate asupra somaclonelor generate prin cultura de țesut (CPF-248) a trestiei de zahăr *(Saccharum officinarum* L.) au demonstrat toleranța sporită la secetă, cu fotosinteză îmbunătățită și răspuns antioxidant. În plus, varianta somaclonală IPSV1 a depășit varianta IPSV2 [230].

Toleranța la stresul salin (0, 40, 80 și 160 mM de NaCI) a fost testată la 32 de linii regenerante din calus utilizând în calitate de explante frunze de vinete *(Solanum melongena),* evaluate în condiții *in vitro* și *in vivo*. S-a observat o toleranță semnificativă la salinitate la patru regeneranți (R18, R19, R23 și R30), a fost de până la 80 mM NaCl, comparativ cu linia parentală (P), nivelul de toleranță fiind până la 40 mM NaCl. Somaclonele au prezentat o scădere a carbohidraților solubili, o creștere semnificativă a amidonului și menținerea unui conținut semnificativ de clorofilă în condiții de salinitate [143].

Pykalo S. și coaut. [262] demonstrează răspunsul genotipic la stresul de salinitate (concentrația de clorură de sodiu de la 0,6 la 1,5%) în cultura de meristeme apicale ale lăstarilor de triticale de iarnă, exprimat prin diferite creșteri de masă brută și potențial morfogenetic diferit. Cea mai rezistentă la stresul salin (1,5% NaCl) s-a dovedit a fi linia 38/1296, care poate fi folosită ca material valoros. Cultura de meristeme apicale de lăstari se recomandă a fi aplicată ca sistem de testare pentru *screening-ul* genotipurilor de triticale rezistente la stresul salin.

Cercetările au arătat în mod repetat că triticale a prezentat o mare diversitate genetică pentru rezistența la stres abiotic cum ar fi seceta, înghețul și frigul, încolțirea înainte de recoltare, înmlăștinirea, salinitatea, deficiența și toxicitatea minerală [44; 45; 69] și, cel mai probabil, această diversitate nu a fost încă pe deplin explorată din cauza cercetării foarte limitate și a eșantionului mic studiat de somaclone. Triticale este, de asemenea, tolerant la pH scăzut (soluri acide), crește bine pe soluri sodice și tolerează soluri bogate în bor [43].

Rezultatele empirice obținute în selecția celulară pentru rezistența la factorii de stres abiotic și biotic [69], variația somaclonală [245] și ingineria genetică [349] confirmă posibilitatea utilizării abordărilor biotehnologice pentru extinderea potențialului genetic de triticale și îmbogățesc genotipurile existente cu multe trăsături. Utilizarea acestor tehnici va necesita un studiu mai detaliat al variației genomice și al stabilității genetice în celulele crescute pe medii nutritive de cultură în condiții *in vitro*. Studiul variației somaclonale la triticale este de interes nu numai pentru cercetarea fundamentală, ci și pentru selecția practică, deoarece somaclonele pot servi ca sursă de diversitate genetică. Prin urmare, studiile citogenetice și genetice moleculare sunt parte integrantă a biotehnologiilor aplicate pentru această cultură, sporind eficacitatea utilizării acestei abordări pentru rezolvarea problemelor aplicate [263].

1.4. Mecanisme de inducere a variabilității *in vitro* la plante

Mecanismele variabilităţii genetice în cultura de celule şi ţesuturi vegetale *in vitro* produc o evoluţie accelerată de reorganizare a cariotipului cu obţinerea variaţiilor somaclonale, determinate de adaptibilitatea biologică a organismului vegetal. Potenţialul variabilităţii somaclonale preexistă şi se realizează în anumite condiţii de cultură a genotipului *in vitro* [370].

În ultimele decenii natura genetică și mecanismele de apariție a variabilității somaclonale au devenit obiectul unei atenții deosebite. Conform datelor din literatură, factorii majori care influențează variațiile somaclonale sunt caracterizați pentru diverse specii de plante derivate prin culturi de țesuturi [117; 158; 159; 272; 363; 368] și pot fi grupați în felul următor:

1. Factori endogeni: a) genetici – genotipul; b) fiziologici – originea, natura și stadiul de dezvoltare a explantului primar și al donatorului de explant;
2. Factori exogeni: a) chimici – compoziția mediului de cultură, concentrația și raportul diferiților reglatori de creștere; b) fizici – condițiile de cultură (temperatura, lumina, umiditatea) și durata de cultivare.

Genotipul are o influență puternică asupra calusogenezei, morfogenezei, regenerării și gradului de variație printre somaclone, de aceea identificarea și *screening-ul* genotipurilor valoroase, ce posedă o rată înaltă de calusare și regenerare *in vitro* sunt extrem de importante în obținerea somaclonelor utilizate ulterior în lucrările de selecție [324].

Rata explantelor inițiale convertite în plantule sau plante integre se referă la eficiența regenerării culturii, care este influențată în principal de genotip și explante. Prezența unui efect genetic puternic a fost raportată pentru grâu [94], mei etiopian [257] și orez [129].

La grâu, numărul de embrioni somatici formați din embrioni imaturi cultivați a fost influențat în principal de genotip, în care soiurile cu cele mai bune performanțe au obținut 1,4-1,8 plante/explant [138]. S-a studiat conjugarea proceselor de morfogeneză în cultura embrionilor imaturi la 15 soiuri de grâu comun de primăvară de diverse origini ecologice și geografice. Polimorfismul soiurilor a fost relevat în ceea ce privește capacitatea de calusare, morfogeneză și regenerare a plantelor. Frecvența calusogenezei a fost de 94,3 %, variind de la 76,6 la 100 % în funcție de genotip. Un proces morfogenetic activ a fost observat în țesuturile calusului la 72 % dintre soiurile testate [380].

Inducerea calusului și frecvența de regenerare a orzului depind de mai mulți factori, principalii fiind: genotipul, sursa explantelor și mediul de cultură [30; 258]. De asemenea, la in (*Linum usitatissimum* L.) se observă formarea calusului și regenerarea lăstarilor *in vitro* pe mediu nutritiv MS, suplimentat cu 0,05 mg/l acid 1- naftilacetic (ANA), 1,0 mg/l 6-

benzilaminopurină (BAP) şi 30 g/l zaharoză. Frecvența calusogenezei (15–100%) și organogenezei (10,0 – 93,8%) sunt influențate de genotip [219].

Eficiența regenerării la 18 genotipuri de mei etiopian (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) a fost studiată folosind ca explant trei dimensiuni de embrioni imaturi (mici, intermediari și mari). Regenerarea *in vitro* a fost afectată semnificativ de genotip și dimensiunea embrionului imatur utilizat ca donator. Embrionii imaturi de mărime intermediară care aveau o lungime de 101-350 μm au condus la cel mai mare procent de regenerare [257].

Calusogeneza, organogeneza și cultura suspensiei celulare de mușețel *(Matricaria chamomilla* L.) sunt direct influențate de genotip. În studiul asupra calogenezei și regenerării *in vitro* la șase genotipuri de mușețel s-a observat că regenerarea a fost 77,5% dependentă de genotip în embriogeneza directă și 77% în cazul embriogenezei indirecte [32].

Astfel, rolul genotipului drept sursă primordială în determinarea existenței și nivelului răspunsului explantelor la cultura *in vitro* este dovedit prin multiple studii și confirmat pentru numeroase specii de plante.

Explantul primar. Originea, natura și stadiul de dezvoltare al explantului primar sunt foarte importante deoarece determină nu doar frecvența de inducere a calusului, tipul de morfogeneză, dar și frecvența variațiilor somaclonale. Mai multe rapoarte au indicat capacitatea totipotentă a celulelor vegetale prin care planta poate fi regenerată, ulterior fiind utilizată pe scară largă în mai multe studii de bază, cum ar fi micropropagarea, conservarea germplasmeișiși formarea plantelor modificate genetic. Regenerarea *in vitro* a plantelor este un proces în care explantele, după ce au fost supuse dediferențierii, diviziunii și diferențierii celulare, formează organe și țesuturi pe parcursul perioadei lor de creștere [92; 369].

Frecvența și natura variației somaclonale sunt influențate de originea sursei de explant. Țesuturile diferențiate, cum ar fi rădăcinile, frunzele și tulpinile produc în general mai multe variații decât explantele, precum meristemele preexistente, cum ar fi mugurii axilari și vârfurile lăstarilor [121; 187]. La plantele medicinale, cele mai eficiente explante, care permit regenerarea lăstarilor direct sau prin calus, sunt reprezentate de fragmente de frunze, fragmente de tulpini nodale și internodale și vârfuri apicale. Diferite tipuri de explante reacționează diferit la aceeași variantă nutrițională. De exemplu, calusurile obținute prin inocularea fragmentelor de internoduri, frunze și rădăcini din *Rhodiola rosea* L. pe mediu Murashige-Skoog (MS), suplimentat cu BAP și 2,4-D, au fost diferite în ceea ce privește culoarea, viteza de proliferare și capacitatea organogenetică [127].

Prin citometria în flux, s-a detectat că calusul inițiat din lăstari a regenerat plante de *Curcuma aromatica* Salisb., sunt preponderent diploide (circa 75 %) sau mixoploide (circa 25%), iar analiza distribuției conținutului de ADN a confirmat prezența celulelor diploide, tetraploide și octoploide [222].

Gramineele prezintă plante cu o dificilă pretabilitate pentru cultura *in vitro*. Frecvenţa formării calusului embriogen şi a regeneranţilor din embrioni imaturi și antere pentru cerealele de bază (*Triticum, Triticale, Oryza*) a variat în limite destul de largi. Au fost elaborate tehnologii de cultivare îndelungată (de peste 2 ani) a ţesutului cu capacităţi înalte embriogene şi de regenerare din embrioni imaturi de grâu cu potenţial diminuat al acesteia pentru obţinerea soiurilor [258].

Embrionii maturi de cereale pot fi introduși în cultură *in vitro* pentru a obține calus [51; 157; 338]. Cu toate acestea, embrionii imaturi, de asemenea, s-au dovedit a fi explante deosebit de promițătoare pentru calusogeneză [218; 292, 336; 337]. La grâu, embrionii imaturi sunt cel mai utilizat tip de explant pentru inițierea culturilor, fiind totodată un obiectde studiu incomod din cauza disponibilității lor temporale și a cerințelor specifice de prelevare, spre deosebire de embrionii maturi care sunt ușor de depozitat și disponibili pe termen lung pentru cercetare [137].

Date similare privind beneficiile în inducerea formării calusului explantelor din stadiile anterioare de dezvoltare au fost obținute în studiul vârfurilor lăstarilor de sorg [97], anterelor imature de grâu [367] și de orez [285], segmente tinere de cotiledon de Arabidopsis [121; 269] și frunze tinere de trestie de zahăr [50]. Aceste rezultate pot fi explicate prin faptul, că inducerea formării calusului implică reprogramarea celulelor explantului inițial cu potențial morfogenetic [158; 159] și ontogenetic [363].

Pentru secară (*Secale cereale* L.) cel mai bun tip de explant pentru regenerarea plantelor s-a dovedit a fi embrionul matur susținut de endosperm, cu cea mai mare rată a calusului embriogen (60%) și eficiență de regenerare (n =1,24) obținute pe mediul MS, care conține maltoză și 12 mg/L picloram [153].

Inducerea calusului și frecvența de regenerare a orzului depind de unii factori, cum ar fi genotipul, sursa explantelor și mediul de cultură [30; 52; 258]. Embrionii imaturi sunt utilizați cel mai frecvent ca sursă de explante pentru regenerarea *in vitro* și transformarea genetică a orzului, datorită potențialului mai înalt de regenerare [134; 279; 298]. Cu toate acestea, embrionii maturi sunt preferabili embrionilor imaturi, deoarece au avantaje precum depozitarea ușoară și disponibilitate rapidă [212]. Pentru inducerea calusului mai frecvent sunt utilizați embrionii maturi susținuți de endosperm [146], precum și embrionii maturi excizați [146; 338].

Sursa și dimensiunea explantului influențează eficiența regenerării. Studiul la orzul de malț soiul Morex a evidențiat că embrionii mai mici (0,5-1,5 mm) au o eficiență de regenerare mai mare decât embrionii mai mari (1,6-3,0 mm) [76]. În mod similar, la iarba Sudanului (*Sorghum sudanense* Piper) embrionii imaturi mai mici (0,7-1,5 mm) au fost mai buni decât cei mai mari (1,6-2,5 mm) în ceea ce privește viteza și frecvența formării calusului și lăstarilor [136]. Au fost studiate diverse tehnici de regenerare *in vitro* pentru meiul etiopian (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter). În calitate de explante în aceste investigații au servit răsaduri, rădăcini, frunze, semințe, spiculețe sau panicule imature și embrioni imaturi, care au asigurat un procent substanțial de regenerare [257].

Perioada și durata de subcultivare. Vârsta culturii și numărul de subcultivări favorizează apariția variațiilor somaclonale. Cu cât o cultură este menținută mai mult timp *in vitro*, cu atât variabilitatea somaclonală este mai extinsă. Variantele cariotipice se acumulează odată cu creșterea vârstei calusului și, ca urmare, cresc șansele de obținere a noi variante de plante în timpul subcultivării succesive [189]. În afară de aceasta, multiplicarea rapidă a țesuturilor, în timpul micropropagarii, poate afecta stabilitatea genetică a acestuia. Khan S. și colaboratorii [182] au raportat că după a opta subcultură, numărul variantelor somaclonale a crescut cu o scădere simultană a ratei de multiplicare a propagulelor la banană.

În mod similar, Clarindo W. și colaboratorii [82] a recomandat limitarea la 4 luni a păstrării suspensiilor agregate de celule de cafea pentru multiplicarea în masă a tipurilor inițiale, deoarece a fost observată instabilitatea ploidiei în cultura *in vitro* pe termen lung.

De asemenea, la cultivarea *in vitro* din internoduri a soiurilor de măsline, s-au observat diferențe semnificative ale caracterelor morfologice la plantele regenerate după a șaptea subcultură, fapt confirmat ulterior prin analiza RAPD [113].

Menționăm că, la creșterea ratei variațiilor somaclonale, în special a culturilor de suspensie celulară și calus, contribuie nu doar numărul de subculturi dar și durata acestora. Studiile au atestat că variația somaclonală este mai evidentă la plantele regenerate din culturi pe termen lung [56]. A fost observat că proliferarea *in vitro* induce hipermetilarea ADN-ului într-un mod dependent de timp, iar modificările metilării ADN-ului sunt implicate în modularea expresiei capacității embriogene în timpul culturii de țesut a palmierului de ulei [281]. Regenerarea plantelor *in vitro* din antere sau microspori izolați din orz [60], triticale [200] și multe alte specii induce numeroase modificări care afectează secvențele genomului și modelele de metilare a ADN-ului [239].

La cultura *Curcuma aromatica*, au fost obținuți regeneranți și s-a dovedit citofotometric caracterul poliploid al unor plante. Frecvența celulelor poliploide a fost mai mare în cazul regeneranților obținuți dintr-un calus cultivat timp de 180 de zile comparativ cu cei dintr-un calus de 6 zile. Conform opiniei unor autori frecvența crescută a celulelor poliploide ar putea fi atribuită subcultivării îndelungate a calusului [222].

Mediile de cultură. Un factor important pentru succesul calusogenezei și regenerării plantelor este componența mediului nutritiv, care include în principal diferite cantități, concentrații și combinații de micro-, macroelemente, vitamine și cel mai important reglatori de creștere [2; 126], în special auxine și citochinine [103].

Mai mulți reglatori de creștere, cum ar fi acidul 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D), acidul naftilacetic (ANA) și BAP (6-benzilaminopurină), derivați sintetici de feniluree (4-CPPU, PBU și 2,3-MDPU) sunt considerați responsabili pentru variabilitatea genetică [313]. Cultivarea îndelungată pe mediul care conține 2,4-D influențează nivelurile mai mari de ploidie ale ADN-ului în celulele calusului [304], iar folosirea acidului 3-indolilacetic (AIA) și a inozitolului în mediul de cultură au indus rearanjamente ADN și modificări de metilare în culturile de calus de morcov (*Daucus carota*) [49].

În literatura de specialitate există date ce indică că, nu doar concentrația, dar și raportul dintre diferiți reglatori de creștere afectează apariția variațiilor *in vitro*. Acidul 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) și acidul 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic (dicamba) au fost utilizați cu succes pentru inducerea calusului la orz [331]. 2,4-D, dicamba și acidul 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic (picloram) au fost testate pentru a determina efectele lor asupra inducerii calusului în cultura de embrioni imaturi de orz [258]. În plus, există cercetări care au fost efectuate pentru a determina efectele acestor auxine asupra formării calusului și regenerării plantelor în cultura de embrioni maturi de orz [338]. De asemenea, rezultate similare au fost obținute la cultura de embrioni maturi de grâu și triticale [52; 68].

Pentru a induce calusogeneza și regenerarea plantelor de triticale, embrioni imaturi și maturi susținuți de endosperm a șase soiuri (BDMT-98-8S, Melez-2001, Mikham-2002, Presto, Tacettin Bey și Tatlicak-97) au fost inoculați pe mediul MS suplimentat cu 2 mg de acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), și respectiv 8 mg de 2,4-D. Cel mai util explant pentru regenerarea plantelor de triticale au fost embrioni imaturi, capacitatea de regenerare constituind 97,3% [68].

Au fost selectate concentrații optime ale componentelor mediilor nutritive în etapele de micropropagare clonală a 3 soiuri de cartofi (Lyubava, Kemerovochanin și Tuleevskiy). A fost studiată, în fazele de reproducere și înrădăcinare a regeneranţilor, influența unor constituienți ai

mediului de cultură (zaharoză, agar-agar, reglatorii de creștere: ANA - acid α-naftil acetic, AIA - acid β-indolil acetic și AIP - acid β-indolilpropionic) S-a evidențiat cea mai bună dezvoltare a plantelor pe mediu nutritiv cu suplinirea de 4 $g*L^{-1}$ de agar - agar, iar adăugarea zaharozei în concentrație de 3-5 % a contribuit la formarea mai multor internoduri [99].

Pentru dezvoltarea și evoluția explantelor, culturile trebuie menținute în condiții controlate de lumină, temperatură, fotoperioadă și umiditate. De exemplu, condițiile de iluminare pot fi stresante pentru explantele inoculate, rezultând regeneranți cu fenotipuri anormale [170].

Reglatorii de creștere a plantelor pot afecta rata variației somaclonale atât direct, cât și indirect prin creșterea coeficientului de multiplicare și inducerea lăstarilor [125].

Regenerarea plantelor *in vitro* este un proces în care explantele, după ce au parcurs reprogramarea, diviziunea și diferențierea celulară, formează organe și țesuturi pe parcursul perioadei de creștere a acestora [93]. Deși principiile de bază ale regenerării plantelor sunt cunoscute de mult timp, mecanismele celulare, moleculare și fiziologice bazate pe acestea sunt în curs de cercetare. Rapoartele recente demonstrează implicarea semnalelor moleculare în răspunsurile organogenezei și embriogenezei. Cu toate acestea, unele modificări celulare, cum ar fi apariția variațiilor somaclonale și a anomaliilor în timpul procesului de regenerare a plantelor *in vitro*, pot fi asociate cu efecte adverse asupra eficacității regenerării plantelor. Studiile anterioare sugerează că, în unele cazuri, regenerarea plantelor implică reprogramarea celulelor somatice distincte, în timp ce în altele, este indusă de activarea celulelor relativ nediferențiate în țesuturile somatice [303].

Regenerarea *in vitro* a plantelor poate fi efectuată prin diverse tipuri de morfogeneză (organogeneză sau embriogeneză somatică) [158]. Organogeneza este procesul de multiplicare a celulelor explantului pe medii adecvate cu inițiere și formare de calus, care proliferează și formează structuri prenodulare, ultimele participând la formarea *de novo* a centrelor morfogene Regenerarea plantelor *in vitro* prin organogeneză este rezultatul formării organelor prin dediferențierea celulelor diferențiate și reorganizarea diviziunii celulare pentru a crea primordii și meristeme cu generare de organe după conexiunea vasculară dintre explant și organul nou regenerat [98].

În embriogeneza somatică, în primul rând, se formează o celulă structurală similară embrionilor zigotici, iar apoi întreaga plantă este regenerată [158; 166]. Embriogeneza somatică este una dintre tehnicile biotehnologice de multiplicare a soiurilor economic importante. Acest proces este bazat pe manifestarea totipotenței celulelor vegetale în care embrionii apar din celule somatice sau vegetative dacă nu are loc fertilizarea [233]. Celulele somatice trec prin stadii de

embriogeneză prin dezvoltarea structurilor asemănătoare embrionilor zigotici fără fuziunea gameților. Embriogeneza somatică ar putea fi potrivită pentru propagarea în masă a speciilor de culturi pe cale de dispariție [59] și pentru producții comerciale.

Deși capacitatea de regenerare a plantelor variază semnificativ în diferite genotipuri, micropropagarea a fost aplicată comercial la nivel mondial. În ultimii ani, au fost studiați mai mulți agenți care reglează regenerarea plantelor, cum ar fi fitohormonii exogeni [163; 233], tipul explantului [259] ce influenează reprogramarea celulelor somatice diferențiate și activarea celulelor relativ nediferențiate în țesuturile somatice [158]. La moment se menține actualitatea studiilor despre influența mecanismelor celulare, moleculare și fiziologice asupra eficienței regenerării plantelor și se discută despre impacul factorilor de dezvoltare și de mediu [303].

Mutageneza – factor de suplimentare a variațiilor genetice. Mutațiile sunt definite ca modificări ereditare ale secvenței ADN, care nu sunt derivate din segregarea genetică sau recombinare [226]. Mutațiile pot fi folosite ca instrument pentru studiile funcționale ale genelor și pentru a crea variabilitate genetică [194]. Ratele de mutație spontană la plantele superioare sunt scăzute, variind de la 10^{-5} la 10^{-8}. Mutageneza este o strategie importantă pentru creșterea frecvenței mutațiilor [87; 203], permițând studii de genomică funcțională și dezvoltarea de noi genotipuri.

Mutageneza indusă este un fenomen unic, frecvența apariției sale într-o populație de celule depășește triplu frecvența mutațiilor spontane care apar în natură. În baza de date FAO/IAEA până în prezent sunt înregistrate peste 3.200 de soiuri de plante, care au fost produse prin mutageneză, mai mult de jumătate dintre soiurile înregistrate provin din orez (*Oryza sativa*), orz (*Hordeum vulgare*), grâu (*Triticum* spp.), soia (*Glycine max*), porumb (*Zea mays*) și crizanteme (*Chrysanthemum* spp.) [109; 307].

Variația genetică a mutanților poate fi indusă fie prin tratamente specifice cu mutageni fizici: radiaţiile ionizante (raze X și raze gama), radiații neionizante (ultraviolete) și radiații corpusculare (protoni, neutroni, particule alfa și beta), chimici (agenţi de alchilare și azide), fie prin cultura de țesut [196; 307].

Mutageneza fizică constă în aplicarea radiațiilor ionizante (X și γ) și neionizante (UV), pentru a genera mutații aleatorii în materialul vegetal [53]. Năutul (*Cicer arietinum*), fiind o cultură autogamă cu compatibilitate sexuală foarte limitată și cu majoritatea genotipurilor sălbatice, a fost tratat cu diferiți mutageni fizici și chimici pentru a îmbunătăți structura genetică și selecta mutanți cu un conținut mărit de clorofilă, proteine și minerale [265]. La orz (*H.*

vulgare), utilizarea razelor X în calitate de mutagen a contribuit la dezvoltarea și selecția formelor mutante cu trăsături agronomice importante (perișori denși, maturitate timpurie) [197].

Radiația gama este unul dintre cei mai utilizați agenți mutageni la plante, deoarece se raportează că induce o variabilitate genetică ridicată [206]. Acest tip de radiație poate fi generat de radioizotopi, cum ar fi carbon - 14 (C^{14}), cobalt - 60 (Co^{60}), cesiu - 137 (Cs^{137}) și plutoniu - 239 (Pu^{239}) [278; 307]. Leziunile primare cauzate de radiațiile gama întârzie sau inhibă diviziunea celulară și afectează activitatea mitotică, rata de creștere, fotosinteza, modularea sistemului antioxidant și acumularea de compuși fenolici. Inducerea eficientă a mutagenezei prin radiație gama necesită determinarea dozei optime de radiație, adică doza care reduce 50 % din populație (doza letală mediană, DL_{50}) [307].

Dozele mari de radiație pot induce radioinhibiția prin afectarea promotorilor de creștere și, în cele din urmă, pierderea capacității regenerative, malformația și distrugerea țesuturilor [317]. Testele de radiosensibilitate permit determinarea dozei adecvate de radiații pentru a induce cea mai mare rată de mutații cu cele mai neglijabile efecte asupra materialului genetic [307]. Stimularea mutațiilor poate fi obținută cu doze mici de radiații care favorizează inducerea metaboliților și a modificărilor biochimice implicate în regenerarea plantelor [317]. La porumb și răsadurile de *Agave tequilana* var. *albastru*, iradiate cu DL_{50} între 20 și 25 Gy s-a indus numărul de lăstari și a crescut dimensiunea răsadurilor, în timp ce la 16 Gy a crescut masa calusului [41]. Pentru *Solanum tuberosum* var. *Désirée* (cartof), DL_{50} de 10 Gy a sporit regenerarea calusului vegetal cu 71 % [41].

Mutageneza *in vitro* oferă posibilitatea de răspândire rapidă și masivă a plantelor mutante [307]. Inducerea mutațiilor prin iradiere gama s-a observat în muguri și semințele colectate din câmp, precum și în culturi de țesuturi, protoplaști și calus [314; 315]. Prin această tehnică, populațiile mari de plante pot fi gestionate în condiții controlate, în spații reduse și în orice perioadă a anului [148]. Pe de o parte, tehnicile biotehnologice *in vitro* garantează calitatea și siguranța, care, combinate cu tehnici de mutageneză, permit selectarea caracteristicilor agronomice remarcabile la plantele de importanță biologică și economică. Utilizarea diferitelor doze (10, 30 și 50 Gy) la explantele de cultură *in vitro* de *Eriobotrya japonica* L. (Loquat) a făcut posibilă accelerarea programelor de reproducere în care combinația de explante apicale cultivate pe mediu MS, a favorizat o creștere mai mare a diametrului calusului, numărului de lăstari, frunze, și înălțimea plantulelor în variantele iradiate cu 10 Gy [381].

În ultimul deceniu au fost înregistrați mutanții *Oryza sativa* L., *Solanum lycopersicum* L., și *Bougainvillea* spp. (FAO/IAEA, 2012). Datele din literatură indica că 92 % dintre mutanții de orez sunt obținuți prin iradiere cu razele γ, care generează variabilitate genetică la majoritatea

genotipurilor cu caracteristicile organoleptice, maturitate timpurie, precum și rezistența la infecția cu *Nilaparvata lugens* [108; 144].

Din semințele de tomate (*S. lycopersicum* L.) supuse radiațiilor s-au obținut mutanți cu randament sporit și calitatea îmbunătățită a fructelor (forma, mărimea și culoarea frunzelor), dar și cu o toleranță mai înaltă la stresul termic (FAO/IAEA, 2012). Efectul radiației gama asupra inducerii rezistenței la stresul salin a fost raportat la cartof *(S. tuberosum* L.) [339].

Plante mutante de orez (*O. sativa* L.) au fost obținute prin iradiere cu razele γ la dozele 50–350 Gy. Astfel, au fost selectați mutanți de orez (50 Gy), care s-au evidențiat prin îmbunătățirea însușirilor agronomice (înălțimea plantei, numărul de freze, greutatea lăstarilor și rădăcinii, biomasa totală și lungimea paniculelor), calitatea nutrițională, toleranța la stres biotic și abiotic (salinitate) și rezistență la erbicide [306; 330].

Numeroase studii au raportat că, cultura *in vitro* separat sau combinată cu mutageneza poate fi utilizată pentru a genera plante cu variabilitate genetică crescută și mutanți, ca o sursă potențială de noi culturi comerciale. La trestia de zahăr (*Saccharum officinarum* L.) au fost investigate mutageneza indusă de raze gama și cultura *in vitro* și toleranța la salinitate (NaCl). Culturile de calus embriogenic au fost iradiate (10 - 80 Gy) iar apoi, calusul iradiat a fost tratat cu NaCl (0, 50, 100, 150, 200 și 250 mmol L^{-1}). Din 138 de clone au fost selectate 18 clone mutante care au prezentat creșterea nivelului de zahăr [235].

Efectele radiațiilor gama asupra plantelor de cafea (*Coffea arabica* L. var. *typica*) din generația M_1 au fost evaluate folosind doze de iradiere de 0, 50, 100 și 150 Gy. La plantele care au supraviețuit iradierii cu doza de 100 Gy au fost observate modificări morfologice pentru forma și vârful frunzei, culoarea frunzelor tinere, înălțimea plantei, diametrul tulpinii, numărul de frunze pe plantă, lungimea și lățimea frunzelor [264].

Mutageneza a contribuit la aducerea pe piață a mii de soiuri de plante cu însușiri fenotipice îmbunătățite precum și performanța agronomică, caracteristicile nutriționale, rezistența la boli, toleranța la factori de mediu, rezistența la erbicide și multe altele [226].

Concluzii la capitolul 1

Analiza literaturii de specialitate denotă la plantele de cultură exstența unei variabilități genetice și diversități limitate, ceea ce le face vulnerabile față de fluctuațiile tot mai accentuate ale condițiilor de mediu și a factorilor limitativi. Sumând informațiile bibliografice se constată:

1. Evaluarea diversităţii genetice prin metodele: morfologice, fiziologice, biochimice, citologice și moleculare pune la dispoziția cercetătorilor un material inițial de

ameliorare cu caractere valoroase, pentru obținerea soiurilor moderne cu rezistență ridicată la factorii de stres biotic și abiotic.

2. Triticalele au o importanță economică deosebită pentru omenire, fiind utilizate în alimentația umană, hrana animalelor și producția de biocombustibil, pentru controlul eroziunii solului, ca cultură de acoperire, iar îmbunătățirea constantă a formelor existente sau crearea de noi soiuri este extrem de importantă.

3. Interesul sporit față de triticale este condiționat de productivitatea înaltă, conținutul însemnat de proteină în boabe cu aminoacizi esențiali, rezistență la iernare, secetă și maladii, toleranță la toxicitatea sărurilor, de asemenea nu este pretențioasă față de sol.

4. Diversitatea genetică în cadrul germoplasmei triticalelor este scăzută, fapt condiționat de durata scurtă de viață a acestei culturi de la crearea ei, iar reproducerea ar trebui să se concentreze pe generarea variabilității genetice în cadrul fondului genetic disponibil pentru a îmbunătăți această cultură promițătoare.

5. Studiul variației somaclonale la triticale este de interes nu numai pentru cercetarea fundamentală, dar și pentru selecția practică, deoarece somaclonele pot servi ca sursă de diversitate genetică, iar pentru extinderea potențialului genetic și îmbogățirea genotipurilor existente poate fi utilizată metoda culturii de țesuturi și celule *in vitro*.

6. Factorii de inducere a variațiilor somaclonale prin metoda culturii *in vitro* pot fi *endogeni*: genetici – genotipul; fiziologici – originea, natura și stadiul de dezvoltare a explantului primar și al donatorului de explant; și *exogeni*: chimici – compoziția mediului de cultură, concentrația și raportul diferiților reglatori de creștere; fizici – condițiile de cultură (temperatura, lumina, umiditatea) și durata de cultivare.

7. Mutageneza indusă este unul dintre cele mai puternice instrumente pentru extinderea variabilității genetice necesare dezvoltării surselor de germoplasmă valoroase. Razele gama induc schimbări citologice, genetice, biochimice, fiziologice şi morfologice în dependenţă de doza iradierii şi sunt pe larg utilizate pentru inducerea variabilităţii la plantele de cultură.

8. În contextul studiilor analizate sunt expuse mai multe raționamente privind rolul radiației gama în cultura *in vitro* ca mutagen în generarea variabilității genetice și obținerea formelor noi de triticale cu caractere valoroase îmbunătățite.

2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELOR DE CERCETARE

Cercetările privind inducerea variabilității genetice au fost realizate prin utilizarea metodelor biotehnologice (calusogeneză, regenerarea *in vitro*, aclimatizarea materialului vegetal) în complex cu mutageneza fizică (iradierea gama), iar pentru evaluarea variabilității somaclonale și induse a genotipurilor de triticale au fost aplicate metode ale geneticii cantitative (analiza caracterelor biomorfologice), citologice, moleculare. Datele experimentale au fost prelucrate prin metode statistice. Au fost aplicate protocoale standard, fiind optimizate şi perfecţionate în funcție de specificul obiectivelor de studiu.

Activitățile experimentale au fost realizate în cadrul Laboratorului Genetica rezistenței plantelor al Institutului de Genetică, Fiziologie şi Protecţie a Plantelor în cadrul proiectelor de cercetare: Programul 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” (2020-2023); 15.817.05.11F „Sisteme de inducere a variabilităţii şi rezistenţei plantelor, procedee tehnologice de sporire a productivităţii culturilor agricole” (2015-2019); 11.817.0.4.04F „Biotehnologii avansate şi mecanisme genetice şi fiziologice de inducere a variabilităţii genotipice şi formarea unui potenţial genetic sporit de productivitate şi rezistenţă a C_3 şi C_4 plantelor” (2011-2014); 06.407.005F „Studiul variabilităţii genetice indusă de factori fizici, chimici şi biologici *in vivo* şi *in vitro*, evaluarea genetico - moleculară a caracterelor de productivitate, calitate şi rezistenţa la condiţiile nocive ale mediului” (2006-2010); 01.14.02F „Biotehnologii moderne (genetico - moleculare) de sorire a variabilităţii ereditare valoroase (rezistenţă, productivitate, calităţi) la plantele de cultură” (2001-2005).

2.1. Materialul și metodologia cercetării

În calitate de material biologic au servit 8 genotipuri de triticale hexaploide: Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Colina, 188TR 5021, LT 76872, Rodlen, CAD 2/917 din colecţia Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, dintre care la 3 genotipuri au fost analizate somaclonele obținute.

Genotipurile studiate prezintă următoarele caracteristici:

Ingen 35 – spic alb, fără pubescență, ariste albe, bob roșu. Spic de mărime medie (9,5-11,0 cm), cilindric, densitate medie (28 – 32 spiculețe per spic). Bobul oval, masa a 1000 boabe constituie 45 – 47 g, conține 13 - 14% proteine și 22 – 24% gluten. Numărul de boabe în spic variază între 52 – 60, în spiculețe între 2 – 3. Perioada de vegetație este 275 – 280 zile și face

parte din grupul plantelor cu precocitate medie. Înălțimea plantelor este de 92 – 94 cm, numărul de tulpini per plantă 2,8 – 3,0.

Tolerant la secetă, iernare, pătulire și maladii (făinare, rugină galbenă și brună, fuzarioză, septorioză).

Ingen 93 – spic alb, fără pubescență, ariste albe, bob roșu. Spic de mărime medie (9,5 - 11,0 cm), cilindric, densitate medie (28 – 31 spiculețe per spic). Bobul oval, masa a 1000 boabe constituie 46 – 47 g,conține 13 - 14% proteine și 22 – 24% gluten. Numărul de boabe în spic variază între 54 – 62, în spiculețe între 2 – 3. Perioada de vegetație este 276 – 282 zile și face parte din grupul plantelor cu precocitate medie. Înălțimea plantelor este de 94 – 96 cm, numărul de tulpini per plantă 2,8 – 3,0.

Tolerant la secetă, ger, cădere și maladii (făinare, rugină galbenă și brună, fuzarioză, septorioză).

188TR 5021 – spic alb, fără pubescență, ariste albe, bob galben. Spic de mărime medie (11,5 - 13,5 cm), cilindric, densitate medie (29 – 33 spiculețe per spic). Bobul oval, masa a 1000 boabe constituie 32 – 35 g. Numărul de boabe în spic variază între 60 – 68. Perioada de vegetație este 276 – 282 zile și face parte din grupul plantelor cu precocitate medie. Înălțimea plantelor este de 100 – 103 cm, numărul de tulpini per plantă 2,9 – 3,0.

Tolerant la secetă, ger, cădere și maladii (făinare, rugină galbenă și brună, fuzarioză, septorioză).

Experiențele au fost efectuate în condiții de laborator, solariu și câmp. În solariu au fost cultivate variantele experimentale și martorul în substrat sol. În câmp experienţele au fost efectuate în variante randomizate în trei repetiții conform recomandărilor standard [84].

2.2. Metoda culturii *in vitro*

Cultura *in vitro* este o metodă de perspectivă pentru obţinerea diversităţii genetice, determinată de variabilitatea somaclonală, care se folosește eficient în inducerea variabilității, prin obținerea somaclonelor ce prezintă interes agronomic [277; 350].

În scopul obținerii culturii de calus a fost selectat materialul vegetal din care s-au prelevat diferite tipuri de explante: embrioni maturi, fragmente de frunză aseptică de diferită vârstă. Materialul steril a fost prelevat de la plantule, obţinute prin regenerare directă în cultura *in vitro* din embrioni maturi inoculaţi pe mediul Murashige-Skoog fără hormoni [227].

Compoziţia şi prepararea mediilor de cultură.

Compoziţia mediului. Una dintre cele mai importante etape este optimizarea și prepararea mediului nutritiv. În cadrul experiențelor s-a utilizat *mediul bazal Murashige-Skoog* [227]. Au fost preparate soluţiile - stoc de: macro- și microelemente, fier chelat, vitamine şi hormoni (Tabelul 2.1).

Pentru *iniţierea calusogenezei și embriogenezei* au fost testate 6 variante de mediu nutritiv cu *mediul bazal Murashige-Skoog*. Procesele de dezvoltare a plantei în cultura *in vitro* sunt dirijate în special de reglatorii de creștere utilizaţi în mediu. În dependenţă de concentraţia auxinelor şi a citochininelor, precum şi a coraportului dintre fitohormoni, depinde tipul de morfogeneză obţinut [2]. Din variantele de mediu testate, s-a stabilit, că mediul de cultură MS suplimentat cu reglatori de creştere acid diclorofenoxiacetic 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l), fiind cel mai optim pentru *inducerea calusogenezei*, suplimentat cu L-asparagină – 150 mg/l, mezoinozitol – 100 mg/l, glicină – 2 mg/l, acid ascorbic – 20 mg/l, zaharoză – 30 mg/l.

Tabelul 2.1. Componenţa mediului Murashige-Skoog (MS)

Compoziția mediului		**MS (Murashige-Skoog, 1962)**
		Cantitatea, mg/l
Macroelemente		
NH_4NO_3	Azotat de amoniu	1650
KNO_3	Azotat de potasiu	1900
$CaCl_2*2H_2O$	Clorură de calciu	440
$MgSO_4*7H_2O$	Sulfat de magneziu	370
KH_2PO_4	Ortofosfat de monopotasiu	170
Microelemente		
KI	Iodură de potasiu	0,83
H_3BO_3	Acid boric	6,2
$MnSO_4$	Sulfat de mangan	22,3
$ZnSO_4*7H_2O$	Sulfat de zinc	8,6
$Na_2MoO_4*2H_2O$	Molibdat de natriu	0,25
$CuSO_4*5H_2O$	Sulfat de cupru	0,025
$CoCl_2*6H_2O$	Clorură de cobalt	0,025
Na_2EDTA	Sare disodică EDTA	37,3
$FeSO_4*7H_2O$	Sulfat feros	27,8
Constituienți organici		
$C_6H_{12}O_6$ +2HCO	Mezoinositol	100
Vitamina B_1	Tiamină HCl	0,1
Vitamina B_6	Piridoxină HCl	0,5
Niacină vitamina B_3	Acid nicotinic	0,5
$C_2H_5NO_2$	Glicină	2
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Zaharoză	30000

Inducerea morfogenezei a avut loc în rezultatul subcultivării fragmentelor de calus pe mediul de cultură MS, suplimentat cu BAP (2,2 mg/l) şi 2,4-D (1,2 mg/l).

Valoarea pH-lui a fost ajustată înainte de autoclavare până la 5,6 - 5,8 cu soluţie de KOH 0,1 N. Mediul de cultură s-a solidificat cu agar 7 g/l.

Sterilizare recipientelor și a mediilor de cultură. Vasele necesare pentru inocularea explantelor și recipientele pentru pregătirea mediilor de cultură s-au sterilizat cu aer fierbinte în dulapuri speciale de uscat la o temperatură cuprinsă între 170- 180°C. Mediile nutritive s-au sterilizat prin autoclavare, în faza de vapori (10 min), apoi aerisire (20 min) şi sterilizare în condiţiile de presiune P=1 atm şi temperatura T=120^{0}C direct în vasele de cultură.

Secţionarea și inocularea explantelor. Manipularea cu explante s-a efectuat utilizând boxa cu flux laminar de aer steril. Embrionii maturi au fost aseptizaţi în soluţie de hipoclorit de sodiu 7 % (1:1) timp de 30 min, apoi au urmat 3-4 spălări repetate cu apă distilată sterilă timp de 1 minut fiecare. Embrionii au fost decupaţi de la endosperm sub lupa binoculară şi sterilizaţi suplimentar în soluţie diluată de hipoclorit de sodiu de 5,2 % (1:1) pentru un minut, apoi clătiţi în apă distilată pentru a reduce contaminarea explantelor. Fragmentele frunzelor tinere prelevate de la plantule sterile au fost secţionate în dependenţă de lungimea frunzelor şi vârsta explantului de la 2 – 12 segmente de 1 - 2 mm şi s-au inoculat pe mediul nutritiv de la partea bazală spre cea apicală.

Incubarea inoculilor s-a desfăşurat în camera de creştere în condiţii controlate, menţinând temperatura 26 ± 2^{0}C, fotoperiodism 16 ore cu o iluminare de 2000 lx şi 8 ore întuneric.

Procesul de formare și creștere a calusului a fost evaluat după câteva zile de la inoculare până la apariția regeneranților. Periodic, la intervalul de 4 - 5 săptămâni pentru menţinerea viabilității calusului în cultură, respectiv multiplicarea acestuia, este necesară transferarea şi subcultivarea pe medii proaspete. Fragmentarea calusului constă în divizarea inoculului şi înlăturarea părţilor necrotizate. Pe parcursul desfăşurării experienţelor au fost efectuate 6 pasaje.

Pe parcurs au fost realizare observații asupra proceselor de calusogeneză, embriogeneză și morfogeneză în funcție de tipul de calus obținut în stabilirea provenienței regeneranților. Astfel, au fost înregistraţi și calculați următorii indici:

- explante cultivate pe mediile de cultură;
- explante cu răspuns calusogenetic pozitiv;
- explante cu răspuns morfogenetic;
- frecvenţa calusogenezei, dedusă după numărul de explante ce au format calus;

-frecvenţa embriogenezei și frecvența regenerării s-au determinat de la numărul explantelor cu răspuns calusogenetic pozitiv.

Regenerarea plantelor. Calusurile cu proprietăţi morfogene au fost transferate pe mediul de regenerare MS suplimentat cu AIA (0,5 mg/l) şi BAP (1 mg/l). După 2 săptămâni s-a observat formarea lăstarilor. Pentru înrădăcinarea regeneranţilor, lăstarii cu lungime de 2,5 - 4 cm au fost transferaţi pe mediul de înrădăcinare MS cu adaos de ANA (1 mg/l). Înrădăcinarea s-a atestat la a 10-cea zi de cultivare.

Aclimatizarea plantelor regenerate. Plantulele cu un sistem radicular bine dezvoltat au fost cu atenţie spălate sub un get de apă pentru a înlătura agarul, apoi au fost sterilizate cu soluţie de $KMnO_4$ și transferate în vase cu substrat sol - turba (3:1) pentru aclimatizare la condiţii *in vivo*. După aclimatizare plantele au fost transferate în ghivece şi cultivate în condiţii de laborator până la maturitate. Aceste plante au fost desemnate ca somaclone și au constituit generația SC_0. Ulterior, somaclonele au fost analizate după un șir de caractere biometrice.

2.3. Metoda mutagenezei fizice

Radiaţiile ionizante s-au dovedit unul din mijloacele eficiente de intervenţie în schimbarea structurii genetice a speciilor, în crearea şi ameliorarea soiurilor, fiind o sursă preţioasă de sporire a variabilităţii genetice.

Razele gama sunt considerate printre cele mai efective raze ionizante, care generând radicali liberi induc schimbări citologice, genetice, biochimice, fiziologice şi morfologice în dependenţă de doza iradierii şi sunt pe larg utilizate pentru inducerea variabilităţii la plantele de cultură [249; 250; 315; 316].

Utilizarea radiațiilor gama și culturii *in vitro* ca sursă de sporire a variabilității somaclonale este determinată de specificul acțiunii lor asupra proceselor de calusogeneză, embriogeneză și regenerare.

Materialul semincer a fost iradiat cu raze gama la instalaţia RXM-γ-20, unde în calitate de sursă radioactivă a servit elementul Co^{60}. Mutageneză cu Co^{60} are un potențial ridicat de penetrare, nu prezintă risc pentru mediu și poate fi utilizat pentru iradierea celulelor, țesuturilor, organelor și plantelor întregi [308].

A fost aplicată iradierea într-o singură repriză cu debit de 0,16 g/sec. Doza optimă depinde de varietate şi este determinată prin experimentare în funcţie de radiosensibilitatea speciei, dozele de iradiere sunt selectate pentru a asigura o frecvenţă înaltă a mutaţiilor, dar şi un grad ridicat de supraviețuire a plantelor [35].

Iradierii au fost supuse 8 genotipuri de triticale (300 semințe pentru fiecare variantă) în doza de 50, 75, 100, 125, 150, 200 Gy. După o zi de repaus seminţele tratate au fost inoculate pe medii de cultură.

2.4. Metoda citologică de studiere a mitozei

Studiul diviziunilor mitotice a fost realizat pe preparate temporare după metoda clasică [377]. Mostrele de calus au fost fixate la diferite termene de cultivare de la inițierea calusogenezei. Calusul a fost fixat în soluţie de alcool - acid acetic glacial (3:1). Probele de calus au fost supuse tratării cu soluţie de alaun de fier (7%), timp de 30 min, apoi hidrolizei şi macerării preventive cu pectinază (0,5%), timp de 1 oră şi 30 min la temperatura de 28°C. Colorarea celulelor calusale a fost efectuată în soluţie carmin-acetică (2%) timp de 24 ore. Pregătirea preparatelor citologice a fost realizată prin tehnica regresivă, aplicând decolorarea în soluţie de acid acetic (45%).

Determinarea cotei celulelor cu aberaţii în metafaza, anafaza, telofaza diviziunilor mitotice şi stabilirea spectrului de mutaţii au fost realizate în rezultatul analizei preparatelor temporare la microscopul Zeiss AXIO a peste 350 de celule calusale la diverse termene de cultivare *in vitro* (în trei repetări).

Indicele mitotic, a fost apreciat ca raportul celulelor aflate în mitoză față de numărul total de celule studiate, aplicând formulă:

$$IM = (NP+NM+ NA+NT / NI +NP+NM+ NA+NT) \times 100\% \text{ , unde} \quad (2.1)$$

NI – numărul celulelor în interfază;

NP – numărul celulelor în profază;

NM – numărul celulelor în metafază;

NA – numărul celulelor în anafază;

NT – numărul celulelor în telofază.

2.5. Analiza polimorfismului genetic prin tehnica RAPD

Materialul semincer a fost colectat de la somaclonele de triticale cu însuşiri agronomice valoroase selectate din descendenţii SC_1, obţinuți din embrioni maturi iradiați cu raze gama (150 Gy) și regenerate *in vitro*. Probele pentru analiză au fost colectate, de la plantele crescute în condiții de laborator, pentru fiecare genotip (30 plante), în faza de 2 frunzulițe, apoi fiind fixate în azot lichid și păstrate la temperatura de - 80^0C, până la etapa de izolare și prelucrare.

Izolarea și purificarea ADN-ului genomic.

Pentru izolarea ADN-ului genomic s-a utilizat kitul *Gene JET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* #K0791 conform protocolului oferit de producător. Cuantificarea calitativă

a ADN-lui total s-a determinat prin analiza electroforetică în gel de agaroză de 1% [287]. În cazul cand probele de ADN isolate din materialul vegetal sunt contaminate cu impuritati se utilizează purificarea cu $LiCl_2$ de 12M:

- S-a adăugat $LiCl_2$ de 12M ca concentrația finală în soluția de ADN se fie de 4M. Probele s-au expus timp de 20-30 min la baia de gheață, apoi s-au centrifughat 10 minute la 10000 rot/min. Supernatantul s-a colectat în eprubete Epindorf curate, precipetatul cu impurități fiind aruncat.
- Supernatantul colectat s-a prelucrat cu soluția de clorură formică și alcool izoamilic în raport de 24:1 în volum egal. S-a centrifughat 5 min la 10000 rot/min, colectat supernatantul.
- S-a adăugat 5M NaCl, astfel ca concentrația finală în soliția de ADN se fie 0.2M. Apoi s-a adaugat un volum egal de izopropanol, s-a centrifughat timp de 2 min.
- Precipitatul s-a spălat cu alcool etilic de 70% cu volum de 1ml, s-a centrifughat 2 min la 10000 rot/min. Etapa s-a repetat de 2 ori. Precipitatul s-a uscat bine. Probele uscate s-au dizolvat în 50 - 100 µl H_2O distilată trecută prin milipori.

Pentru realizarea reacțiilor de amplificare s-au preparat câteva diluții (între 1-15 ori) a fiecarei probe de ADN în scopul selectării unei cantități de ADN ideale și pentru a evita blocarea amplificarii.

Analiza cu primeri RAPD.

Estimarea variabilității genetico-moleculare a somaclonelor de triticale a fost realizată prin analiza RAPD, tehnică rapidă de identificare a polimorfismului genomic [207; 241]. Pentru analiză au fost utilizați 12 primeri arbitrari (Tabelul 2.2).

Tabelul 2.2. Lista primerilor microsatelitici utilizați pentru analiza RAPD

Nr.	Denumirea primerului	Succesiune nucleotidică (5′ → 3′)
1.	OPB-12	5’-CCTTGACGCA-3’
2.	OPB-14	5’-TCCGCTCTGG-3’
3.	OPC-05	5’-GATGACCGCC-3’
4.	OPC-07	5’-GTCCCGACGA-3’
5.	OPF-08	5’-GGGATATCGG-3’
6.	OPD-07	5’-TTGGCACGGG-3’
7.	OPA-11	5’- GTGCCTAACC-3’
8.	OPG-6	5’-AGGGCCGTCT-3’
9.	OPG-10	5’-CTACTGCCGT-3’
10.	OPE-17	5’-TCTCCGCCCT-3’
11.	OPI-16	5’-AATGGCGCAG-3’
12.	OPH-15	5’-CAATCGCCGT-3’

Reacțiile de amplificare au fost realizate într-un volum de 15 µl per probă cu următoarele componente: 50-70 ngADN, dNTP 200 µM de fiecare tip (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), primer 0,4µM, 1U/µl DreamTaq Green ADN polimerază în soluție tampon (1x); apă ultrapură; 2,5 mM $MgCl_2$ (*Thermo Scientific*). Procesul de amplificare a decurs în termociclul automat Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700 (Singapore), conform următorului program: 95ºC – 5 min, 35 cicluri: 95ºC – 1 min, 36ºC – 1 min, 72ºC – 1 min, elongarea finală 72ºC – 5 min, pentru primerii cu 60% raport G/C iar pentru cei cu 70%: 95ºC – 5 min, 35 cicluri: 95ºC – 1 min, 38ºC – 1 min, 72ºC – 1 min, elongarea finală 72ºC – 5 min.

Ampliconii au fost analizaţi prin electroforeză în gel de agaroză de 2% (2g agaroza, 2ml TAE 10x, la volumul de 100 ml) în prezenţa bromurii de etidiu 0,5 µg/ml [287]. Analiza RAPD a fost realizată cu 12 primeri decameri (Tabelul 2.2). Produşii de amplificare au fost vizualizaţi cu ajutorul transiluminatorului UV şi sistemului de documentare a gelului DOC - PRINT-VX2.

Detectarea şi stabilirea mărimii fragmentelor de ADN amplificate a fost realizată cu ajutorul programului Total Lab. Pentru evidenţierea polimorfismului generat de fiecare marker s-a utilizat *indicele PIC* (Polymorphic Information Content) după Anderson J. [39]:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} {p_i}^2 \qquad (2.2)$$

unde p_i – frecvenţa benzii, şi n – numărul de benzi depistate.

Distanţa genetică (DG) s-a determinat după Melchinger A. [211] și Nei M. [231] pe baza *indicelui de similaritate Jaccard* aplicând SG conform:

$$DG = -\ln(SG) \qquad (2.3)$$

În baza matricelor generate s-au elaborat dendrogramele de repartiție a genotipurilor, utilizând metoda UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method with Arithmetic mean) [333].

2.6. Evaluarea caracterelor cantitative

Caracteristicile biometrice în cultura *in vitro* au fost studiate prin indicii: masă calusului, numărul lăstarilor proliferați, lungimea și lățimea frunzelor, lungimea spicului, numărul de internoduri și talia plantulelor regenerate.

În timpul perioadei de vegetație, plantele urmează mai multe etape (faze) bine definite, care se manifestă prin modificări ale aspectului exterior datorită formării și creșterii diferitor organe: frunze, tulpini, inflorescențe [17]. Evaluarea perioadei de vegetație, care include fazele și stadiile de vegetație s-a efectuat conform scării Zadocks [344].

Aprecierea valorică a caracterelor cantitative a fost realizată cu ajutorul metodelor biometrice pentru indici după ghidului UPOV [154]. Somaclonele de triticale au fost analizate

după următorii parametri: talia plantei, numărul de fraţi fertili, lungimea spicului principal, numărul de internoduri, numărul de boabe, greutatea boabelor per plantă. Măsurările liniare au fost efectuate cu rigla.

Pe parcursul perioadei de vegetație au fost determinate tipurile de variații morfologice observate la nivelul spicului.

2.7. Analiza statistică a datelor experimentale

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin calcularea următorilor parametri: *valoarea medie* ($\bar{x}$), *eroarea standard* (es), *coeficientul de variaţie* (CV, %). Toate datele sunt prezentate ca medie ± eroarea standard a mediei.

Coeficientul de heritabilitate s-a calculat în sens larg după formula:

$$h^2 = V_g / V_{ph} \quad (2.4)$$

unde V_g -varianța genotipică, V_{ph} - varianța fenotipică.

Estimarea *variaţelor genotipică* și *fenotipică* s-a calculat după Falconer D. [106]:

$$V_g = M_{pg} - E_{mp}/r \quad (2.5)$$

$$V_{ph} = V_g + V_E/r \quad (2.6)$$

unde M_{pg} - media pătratică genotipică a parametrului, E_{mp} - eroarea reziduală sau varianța mediului (V_E), r - numărul de observații.

Pentru estimarea *coeficientului variației genotipice* (C_{VG}) și *coeficientului variației fenotipice* (C_{VF}) s-au aplicat formulele conform Singh R., Chaudhury B. [305]:

$$C_{VF}(\%) = 100 * \sqrt{V_{ph}} / \bar{x} \quad (2.7)$$

$$C_{VG}(\%) = 100 * \sqrt{V_g} / \bar{x} \quad (2.8)$$

unde, $\bar{x}$ – media generală a caracterului.

Avantajul genetic (AG, Genetic Advance) în valori relative s-a calculat conform formulei:

$$AG = k\sqrt{V_{ph}} * h^2 \quad (2.9)$$

unde k - coeficientul selecției (k = 2,06 %), semnificația 5%,

$$AG(\%) = AG/\bar{x} * 100 \quad (2.10)$$

Experiențele s-au efectuat după schema analizei dispersionale, în analiza statistică s-a utilizat pachetul de programe STATGRAPHICS Plus 5.0. Analiza variaţiei și determinarea puterii de influență a genotipului, explantului, mediului de cultură și interacțiunii lor asupra parametrilor analizați s-a efectuat prin aplicarea testului ANOVA, iar pentru aprecierea diferenţelor semnificative dintre variante s-a utilizat testul Student. Reprezentarea grafică,

textuală și tabelară a fost efectuată prin intermediul programelor Microsoft Word și Excel în mediul Windows 2010.

Concluzii la Capitolul 2

Strategia de cercetare include următoarele etape:

1. Caracterizarea genotipurilor hexaploide de triticale: Ingen 35, Ingen 93 și 188TR 5021 - ca obiect de studiu al cercetărilor.

2. Pentru inducerea variabilității somaclonale a fost utilizată metoda culturii *in vitro* și mutageneza experimentală (prin iradiere cu raze gama) (elaborat algoritmul de inițiere a culturii *in vitro* începând cu procesele de calusogeneză până la regenerarea și aclimatizarea somaclonelor pentru sisteme experimentale – explant-genotip-radiație).

3. Estimarea variabilității genetice induse de cultura *in vitro* și radiația gama a fost apreciată prin metode citologice de studiu (evidențierea celulelor cu aberații a diviziunilor mitotice şi stabilirea spectrului de mutaţii în celulele calusale), molecular-genetice (analiza polimorfismului genetic prin tehnica RAPD) și biometrice (evaluarea caracterelor cantitative).

4. Veridicitatea datelor experimentale a fost realizată prin analiza statistică a datelor obținute cu ajutorul pachetului de programe STATGRAPHICS Plus 5.0.

3. APRECIEREA POTENȚIALULUI MORFOGENETIC ŞI REGENERATIV AL GENOTIPURILOR DE TRITICALE ÎN CULTURA *IN VITRO*

În ultimele decenii culturile de celule şi ţesuturi stau la baza biotehnologiilor moderne, ce au ca scop, manipularea genomului în vederea creării de genotipuri noi, utilizarea în programele de ameliorare a plantelor având ca sursă tehnici experimentale pentru accelerarea metodelor existente de propagare a plantelor şi de obţinerea produselor vegetale dorite [167; 323]. Metodele biotehnologice, prin aplicarea tehnicilor de cultură *in vitro* reprezintă o cale sigură pentru obţinerea unui material biologic liber de agenţi patogeni, conservarea resurselor genetice şi calea cea mai rapidă pentru crearea şi multiplicarea genotipurilor.

Regenerarea şi organogeneza *in vitro* la unele specii de plante constituie o condiţie esenţială pentru multiplicarea plantelor respective pe cale vegetativă. Procesele de morfogeneză şi organogeneză se realizează sub influenţa factorilor endogeni şi exogeni. Natura fitohormonilor utilizaţi precum şi concentraţia lor, fluctuațiile balanţelor hormonale joacă un rol important în procesele de organogeneză [323].

3.1. Iniţierea calusogenezei şi regenerării de plantule din embrioni maturi de triticale

Cultura *in vitro* reprezintă un sistem de cultivare a organelor, ţesuturilor şi celulelor specifice pe medii artificiale care conţin toate componentele necesare creşterii şi dezvoltării plantelor, în condiţii asepticice [126]. Condiţiile de cultivare *in vitro*, în special balanţa hormonală a mediilor de cultură, suplimentarea mediilor, la diferite etape a microevoluţiei celulare, influenţează iniţierea, proliferarea ţesuturilor calusale şi capacitatea lor de regenerare. S-a demonstrat că sursa explantelor, genotipul și compoziția mediului influențează frecvența inducției și regenerării calusului în cultura de țesut [32, 118; 258].

3.1.1. Optimizarea mediilor de cultură pentru inducerea calusogenezei

Compoziția mediilor de cultură, și anume a reglatorilor de creștere a plantelor, sunt factori cheie determinanți care controlează formarea și proliferarea calusului, formarea embrionilor somatici, regenerarea și înrădăcinarea plantelor [224; 243]. Raportul auxină și citochinină este cel mai important factor în acest sens. Auxinele (acid 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4-D), dicamba, acid 1-naftilacetic (ANA), acid 3-indolilacetic (AIA), acid 3-indolilbutiric (AIB), picloram) și citochininele (6-benzilaminopurina (BAP), kinetina (KN), zeatina) sunt utilizate pentru cultura *in vitro* la o gamă largă de specii de plante. Tipul și concentrația de

auxină determină embriogeneza somatică, inclusiv la cerealiere. În studiile anterioare, cercetătorii au utilizat 2,4-D ca auxină exogenă pentru inducerea calusului la grâu și alte cereale [209; 282]. Rezultatele obținute în conformitate cu rapoartele anterioare ale unor cercetători demonstrează, că pentru inducerea calusogenezei la triticale 2,4-D este utilizat în mod eficient pe embrionii zigotici imaturi și în cultura anterelor (2 mg/l – 2,4-D și 0,5 mg/l – kinetină) [68; 209; 258]. Cercetările au demonstrat că acest tip de auxină în concentrații mai mari are un efect negativ asupra dezvoltării embrionilor somatici, crescând instabilitatea cromozomială și provocând variații somaclonale [348].

În scopul optimizării mediilor pentru inducerea proceselor de calusogeneză la triticale au fost testate 6 medii nutritive ce aveau ca bază mediul Murashige şi Skoog (1962) suplimentat cu acid 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D), acid alfa naphtilacetic (ANA) şi kinetină (K). Fiecare variantă se deosebea prin raportul concentraţiei de auxine şi citochinine (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Compoziția mediilor de cultură pentru inducerea calusogenezei și embriogenezei

Varianta mediului	Mediul de bază	Concentraţie (mg/l)			Zaharoză (g/l)	Maltoză (g/l)
		2,4-D	kinetină	ANA		
1	MS	3,0	-	-	30	-
2	MS	2,5	0,2	-	30	-
3	MS	2,0	0,5	-	30	-
4	MS	2,5	0,4	-	30	-
5	MS	2,0	-	-	-	30
6	MS	-	1,0	0,5	30	-

Notă: MS – mediul Murashige&Skoog, 2,4-D – acid 2,4-diclorofenoxiacetic; K – kinetină; ANA – acid alfa-naftilacetic.

Carbohidrații sunt esențiali în creșterea și dezvoltarea plantelor, fiind substraturile cheie pentru respirație și metabolism. Este cunoscut faptul, că tipul de carbohidrați din mediul nutritiv influențează frecvența inițierii embriogenezei somatice și regenerării de plantule [232]. Cel mai des în cultura *in vitro* sunt folosite glucoza, zaharoza și maltoza. Moleculele mici de zahăr pot pătrunde în celule și pot deshidrata embrionii somatici, favorizând astfel maturarea lor [195].

Zaharoza este principalul carbohidrat din compoziția mediilor nutritive pentru proliferarea masei calusale. S-a constatat, că embrionii somatici crescuți pe un mediu care conține 3% zaharoză dobândesc rezistență la secetă, iar maltoză reduce această proprietate. Utilizarea zaharozei în concentrație de 30 g/l comparativ cu maltoza, a crescut semnificativ calusogeneza la liniile studiate de floarea-soarelui, depășind linia standard cu 14% [364].

În mod similar, s-a constatat că maltoza îmbunătățește creșterea și regenerarea calusului la grâu pentru embrioni imaturi în comparație cu alte surse de carbon. În plus, în comparație cu glucoza și zaharoza, maltoza poate inhiba mai eficient brunificarea celulelor vegetale [202].

Conform rezultatelor, s-a constatat că inducerea calusogenezei la triticale nu a fost afectată de tipul surselor de carbohidrați, fapt demonstrat și de alți autori. La secară au fost testate 2 surse de carbon: 30 g/l zaharoză și 40 g/l maltoză, diferențe fiind nesemnificative între sursele de carbohidrați în ceea ce privește formarea calusului și lăstarilor [139]. Astfel, în experiențele ulterioare s-a utilizat zaharoza ca sursă de carbon.

Începând cu primele zile de la inocularea embrionilor maturi de triticale s-au efectuat observaţii asupra iniţierii şi dezvoltării calusului. După 5-6 zile de cultură *in vitro* s-a stabilit iniţierea de calus în toate variantele, dar masa şi culoarea acestuia a variat în dependenţă de concentraţia citochininelor în mediul de cultură.

În investigațiile efectuate s-a atestat formarea cu preponderenţă a două tipuri de calus: calus compact, globular de culoare verde – tip I, şi calus friabil, alb-gălbui – tip II. În unele cazuri s-a observat iniţierea calusurilor mixte. Pe parcursul experienţelor s-a urmărit activitatea morfogenetică a calusurilor de tip I şi II. În variantele experimentale s-a iniţiat cu preponderenţă calus de tip I (Figura 3.1).

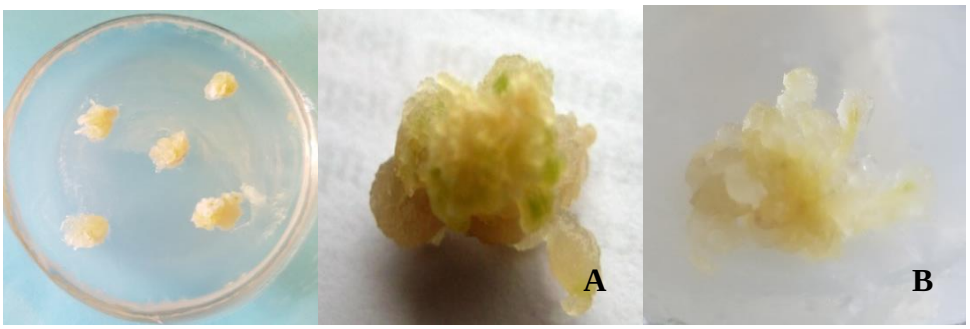


Fig. 3.1. Tipurile de calus inițiate: A – calus compact (tip I); B – calus friabil (tip II).

Din variantele de mediu testate, s-a stabilit, că mediul de cultură MS (1962) suplimentat cu 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l) - mediul Nr. 2, stimulează intensitatea acumulării biomasei calusale (98%), calusul obţinut fiind compact, globular de culoare verde cu zone meristematice bine definite (Figura 3.2). Pe mediul Nr. 1 iniţierea calusului a constituit 75%, fiind de culoare alb-gălbuie, friabil, cu o rizogeneză intensă, iar pe mediul Nr. 5, cu concentraţia 2,4-D (2,0 mg/l) iniţierea calusului a fost de 51,06%, procesul de regenerare nu s-a observat, calusul fiind de culoare albă cu zone morfogene slabe.

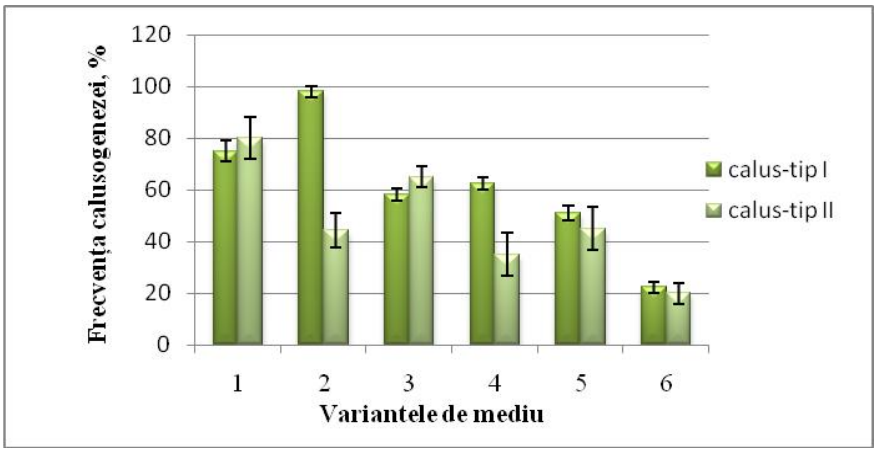


Fig. 3.2. Tipul de calus format în dependență de mediul de cultură.
(aici și în următoarele figuri barele reprezintă eroarea standard).
Notă: **1** – MS + 2,4-D 3,0 mg/l; **2** – MS + 2,4-D 2,5 mg/l + kinetină 0,2 mg/l; **3 –** MS + 2,4-D 2,0 mg/l + kinetină 0,5 mg/l; **4** –MS + 2,4-D 2,5 mg/l + kinetină 0,4 mg/l; **5** – MS + 2,4-D 2,0 mg/l; **6** – MS + kinetină 1,0 mg/l + ANA 0,5 mg/l.

În rezultatul cercetărilor s-a atestat, că pe mediile de cultură a fost indus calus primar la toate 8 genotipuri de triticale luate în studiu: Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Polonez LT 76872, Rodlen, Colina, 188TR 5021, CAD 2/917 (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Influenţa compoziţiei mediilor de cultură asupra frecvenţei calusogenezei din embrioni maturi la diferite genotipuri de triticale

Genotip	Variante de mediu (V)	Explante cultivate (nr.)	Explante cu răspuns pozitiv (nr.)	Frecvența calusogenezei (%)
Ingen 33	1	20	11	55
	2	20	18	90
	5	20	8	40
Ingen 35	1	20	18	90
	2	20	19	95
	5	20	10	50
Ingen 93	1	20	15	75
	2	20	19	95
	5	20	12	60
Polonez LT 76872	1	20	16	80
	2	20	19	95
	5	20	10	50
Rodlen	1	20	14	70
	2	20	19	95
	5	20	7	35
Colina	1	20	10	50
	2	20	12	60
	5	20	9	45
188 TR 5021	1	20	14	70
	2	20	19	95
	5	20	12	60
CAD 2/917	1	20	16	80
	2	20	19	95
	5	20	13	65

Notă: **V-1 -** MS+2,4-D 3,0mg/l; **V-2 -** MS+2,4-D 2,5mg/l + kinetină 0,2 mg/l; **V-5 -** MS+2,4-D 2,0mg/l.

Prin urmare, datele prezentate demonstrează că frecvenţa calusogenezei a variat în funcţie de genotip şi mediul de cultură. Dintre mediile analizate, cele mai înalte rate de calusare au fost obţinute pe mediul MS (1962) suplimentat cu 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l) (mediul Nr. 2) dovedit eficient la toate genotipurile de triticale (90 - 95%). Astfel, nivelul de pretabilitate a genotipurilor a fost proxim, ceea ce înseamnă că mediul de cultură are o influenţă semnificativă [6]. Totodată, analiza datelor scoate în evidenţă necesitatea stabilirii unui mediu optim pentru fiecare genotip individual. În variantele de mediu Nr. 5, rata calusării la genotipurile Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Polonez LT 76872, Rodlen, Colina, 188TR 5021, CAD 2/917 a fost 40, 50, 60, 50, 35, 45, 60, 65% respectiv, fiind evidenţiate concentraţiile variate pentru capacitatea de calusare a genotipurilor. Totuşi, este dificil de identificat specificitatea reacţiei fiecărui genotip în parte.

Rezultatele obţinute demonstrează că concentraţia de fitohormoni în mediu, îndeosebi a auxinei, cât şi interacţiunea ei cu alţi factori constituenți ai mediului de cultură afectează procesele calusogenetice [11]. Astfel, concentraţia de 2,4-D are o importanţă majoră în formarea unui răspuns calusogenetic pozitiv la triticale, demonstrat și de alți cercetători [263].

Datele experimentale prezentate denotă că la genotipul CAD 2/917 frecvenţa calusării este majorată (65 - 95%) la toate variantele de mediu, ceea ce poate fi explicat prin faptul că, genotipul CAD 2/917 a manifestat o capacitate înaltă de calusare. Ulterior conform schemei analizei dispersionale bifactoriale s-a efectuat aprecierea impactului mediului nutritiv şi genotipului, precum şi interacţiunea lor asupra frecvenţei calusogenezei.

În urma prelucrării statistice, prin aplicarea testului ANOVA (Tabelul 3.3) s-a constatat că mediul de cultură, genotipul cât şi interacţiunea lor au avut o influenţă semnificativă ($P \leq 0,001$) asupra frecvenţei inducerii calusului din embrioni maturi la triticale.

Tabelul 3.3. Analiza varianţei frecvenţei calusogenezei din embrioni maturi

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	Puterea de influenţă (%)
Genotipul (G)	8921,9	7	1274,55	5,44***	9,3
Mediul (M)	33331,3	5	6666,26	35,55***	34,9
Interacţiunea GM	15718,8	35	449,10	2,40***	16,4
Rezidual	37500,0	160	234,38	-	-
Total	95471,9	199	-	-	-

Notă: *** - semnificativ pentru $P \leq 0,001$

Cercetările efectuate atestă contribuția tuturor factorilor, precum și interacțiunea lor asupra frecvenței calusogenezei, diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%. Se evidenţiază

o influenţa mai puternică a mediului de cultură 34,91%, genotipul reprezintă o sursă de variaţie de 9,3% şi interacţiunea genotip – mediu 16,46%.

3.1.2. Interacţiunea factorilor „genotip” - „vârsta explantului” în baza frecvenţei calusogenezei

Biotehnologiile moderne nu oferă rezultatele scontate fără prezenţa sistemului celular înalt embriogen. Aceasta presupune alegerea cu grijă a tipului de explant, naturii şi a stadiului de dezvoltare a acestuia pentru obţinerea stabilă a calusului embriogen şi a unui potenţial regenerativ înalt, fiind unul din aspectele importante pentru selectarea eficientă a formelor de triticale [68; 240].

În calitate de explante se pot folosi diverse organe vegetative şi generative ce conţin ţesut meristematic (frunze, rădăcini, internoduri, seminţe, embrioni maturi şi imaturi) [135; 341]. Pentru cerealiere explantul tradiţional este embrionul imatur, pe baza căruia sunt elaborate sisteme celulare cu potenţial regenerativ înalt, la grâu [137; 320], orz [169], orez [332], porumb [312]. Utilizarea acestui tip de explant prezintă unele dezavantaje: pentru creşterea plantulelor donor şi obţinerea embrionilor imaturi sunt necesare perioade specifice de creștere, condiții de mediu, cum ar fi lumina, temperatura, apa, bolile, dăunătorii etc [340].

În vederea soluţionării acestui deziderat în ultimul timp tot mai mult a crescut interesul faţă de frunze, ca explant, fiind o alternativă a embrionilor imaturi a cerealierelor [341]. În acest context sunt obţinute rezultate pozitive la plantele de ovăz [286], secară [139] şi sorg [97]. Un avantaj în utilizarea frunzelor ca explant pentru aceste culturi este şi faptul că prelevarea materialului vegetal nu depinde de anotimpul anului şi în timp scurt poate fi obţinut material steril.

Cercetările denotă că, intensitatea sporită a calusogenezei, embriogenezei somatice şi regenerării plantulelor depinde de un şir de factori: genotip, originea explantului primar, condiţiile de cultivare şi compoziţia hormonală a mediului. Având drept explant, limbul foliar a fost studiată influența interacțiunii factorilor „genotip” - „vârsta explantului”.

În scopul cercetării asupra proceselor de calusogeneză s-au iniţiat culturi de calus din explante de frunză de la 8 genotipuri de triticale (Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Polonez LT 76872, Rodlen, Colina, 188TR 5021, CAD 2/917). Plantulele aseptice au fost cultivate pe mediul bazal MS fără hormoni timp de 2 - 6 zile. Frunzele plantulelor sterile au fost secţionate în dependenţă de lungimea frunzelor şi vârsta explantului de la 2 - 12 segmente, fiecare segment fiind de 1 mm şi inoculate pe mediul de cultură pentru inducerea calusogenezei de la partea

bazală spre cea apicală. Varianta optimă folosită pentru iniţierea calusului avea la bază mediul Murashige - Skoog (1962) suplimentat cu 2,4-D (2,5mg/l), kinetină (0,2mg/l).

Începând cu primele zile după inoculare s-au efectuat observaţii asupra iniţierii şi dezvoltării calusului la nivelul explantelor cultivate. Ca rezultat s-a constatat o diferenţiere în ceea ce priveşte procesul de formare a calusului. Astfel, în partea bazală s-a format calus la toate genotipurile, constituind 50,22 - 66,21%, indiferent de vârsta explantului. Cota maximă de formare a calusului s-a atestat la segmentele bazale la a 2-a zi de cultivare (78,63%). O diminuare a ratei de formare a calusului s-a atestat la a 4-a şi a 6-a zi de cultivare (51,54 - 40,83%) (Tabelul 3.4). Calusul format fiind compact, gălbui cu mici zone morfogene. Este important de menţionat că pe partea apicală a frunzei nu s-a format calus.

Analiza dispersională a rezultatelor obţinute, denotă o influenţă semnificativă $P \leq 0{,}001$ a vârstei explantului şi a genotipului în stabilirea unui răspuns calusogenetic pozitiv. Frecvenţa calusogenezei pentru calusurile iniţiate din limb foliar, atestă cele mai mari valori la a 2-a zi de cultivare, prezentate în ordinea descreşterii valorilor pentru genotipurile CAD 2/917 (89,12%), LT 76872 (81,32%), Ingen 35 (80,67%), Ingen 33 (80,37%), Rodlen (80,19%), 188TR 5021 (74,91%), Ingen 93 (72,74%), Colina (69,56%) (Figura 3.3).

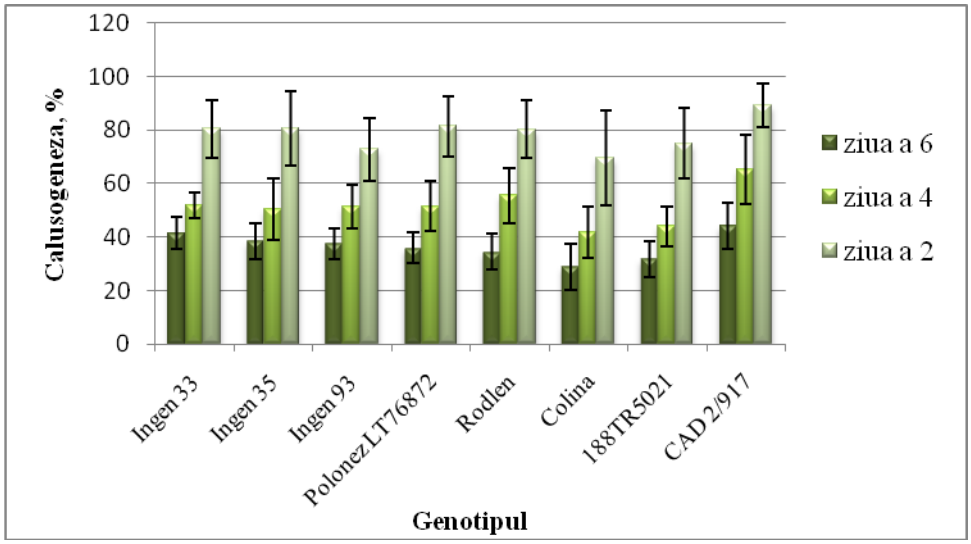


Fig. 3.3. Influenţa interacţiunii factorilor „genotip" - „vârsta explantului"asupra frecvenţei calusogenezei.

Aprecierea acţiunii factorilor primordiali (genotipul, vârsta explantului) şi interacţiunii acestora asupra frecvenţei calusogenezei s-a efectuat conform schemei analizei dispersionale bifactoriale. S-au cercetat 576 combinaţii a câte 72 pentru cele 8 genotipuri; 192 pentru vârsta explantului (2, 4 şi a 6-a zi de cultivare); 24 pentru interacţiunea „genotip" – „vârsta explantului".

Conform datelor obținute se atestă că, capacitatea de calusare la triticale este controlată de vârsta explantului şi genotip [10]. Astfel, în urma aplicării testului ANOVA (Tabelul 3.4) s-a constatat, că genotipul, vârsta explantului cât şi interacţiunea lor a avut o influenţă semnificativă P≤0,001, P≤0,05 asupra frecvenţei inducerii calusului. Influenţa maximă 70,64% a fost înregistrată pentru vârsta explantului, apoi genotip cu 6,68%, în timp ce interacţiunea „genotip" – „vârsta explantului" a constituit doar 0,94%.

Tabelul 3.4. Analiza varianţei frecvenţei calusogenezei induse din fragmente foliare

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	Puterea de influență (PI, %)
Genotipul (G)	16585,7	7	2369,4	24,23***	6,68
Vârsta explantului (E)	175406,0	2	87703,2	897,05***	70,64
Interacțiuni (GE)	2337,92	14	166,9	1,71*	0,94
Rezidual	53968,2	552	97,8	-	
Total	248298,0	575	-	-	

Notă: *, *** - semnificative pentru P≤0,05; P≤0,001.

Analiza comparativă a rezultatelor privind capacitatea calusogenezei pentru explantele analizate a scos în evidență eficiența utilizări embrionilor maturi de triticale față de fragmentele de limb foliar și însușirile prioritare în dependență de genotip.

3.1.3. Capacitatea de regenerare a plantulelor din calusul obţinut de la embrionii maturi de triticale

Obţinerea calusului morfogen şi regenerarea plantulelor este o parte indispensabilă a biotehnologiilor vegetale [193]. Dificultăţile care apar frecvent la depăşirea acestor etape sunt caracteristice în special pentru culturile *in vitro* celulare, tisulare şi de organe ale cerealelor. Calusul embriogen este capabil să regenereze prin procese embriogenice și organogenice, în timp ce capacitatea de regenerare este scăzută sau nulă la calusul nonembriogen [233].

În pofida faptului că regenerarea unei plante integre din celule calusale cultivate este descrisă pentru mulţi reprezentanţi ai cerealierelor: grâu, porumb, orez, orz, secară [97; 153; 238; 239], perfecţionarea sistemului *in vitro* de obţinere a regeneranţilor de triticale rămâne actuală din cauza multor determinanți necunoscuți [200; 243]. Embriogeneza somatică este crucială pentru procesele de transformare a cerealelor, deoarece embrionii somatici servesc ca material ideal pentru studiile de modificare genetică datorită competenței lor de a exprima ADN-ul încorporat [243]. Prin urmare este esenţial să se stabilească inducerea eficientă de calus şi a specificului etapelor de regenerare.

Inducerea calusului care formează embrioni somatici (calus embriogen) este cel mai important pas pentru stabilirea unui sistem eficient în cultura de țesut [224].

S-au iniţiat 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 [362; 378]. Datele din literatură prezintă dovezi precum că, mai întâi, se formează un calus nonembriogen, care fie rămâne o masă calusală pe durata cultivării, fie intră pe calea transformării într-un tip embriogen [378], însă în investigațiile realizate s-a observat că, calusul nonembriogen, pe tot parcursul cultivării explantelor, nu a format centre meristematice și nici nu a fost observată embriogeneza somatică. Observațiile ulterioare au fost efectuate în vederea aprecierii calusurilor embriogene, cu formare de lăstari, care au evoluat din calus primar, cât și din cel secundar, supus subcultivării pe mediu pentru inducerea morfogenezei (Figura 3.4).

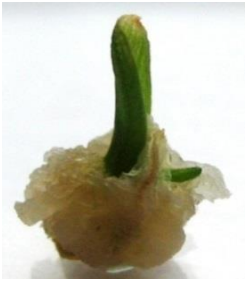


Fig. 3.4. Inițierea proceselor regenerative.

În sistemele experimentale studiate au fost inoculaţi pe mediul MS cu 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l) 720 de embrioni maturi de triticale. Începând cu primele zile de inoculare s-au realizat observaţii în procesul de creştere al explantelor inoculate. După 7-8 zile de cultivare la nivelul explantelor s-au atestat primele semne ale reacţiei acestora la condițiile de cultivare.

Toate genotipurile analizate au format calus, fiind atestate structuri compacte galben-verzuie. Rezultatele obţinute au scos în evidenţă faptul, că genotipul CAD 2/917 a format calus embriogen cu cea mai înaltă rată, constituind 82%, iar genotipul LT 76872 cu 43,33%, ce a prezentat cel mai redus potenţial de calusare (Tabelul 3.5). După 14 zile de cultivare, la nivelul explantelor s-a atestat o intensificare a proceselor morfogenetice (Figura 3.5).



Fig. 3.5. Iniţierea proceselor morfogenetice.

S-a stabilit, că utilizarea în mediul de cultură a reglatorilor de creștere în diferite concentrații influențează puternic inducerea și regenerarea calusului. S-a constatat că prezența auxinelor în mediul de cultură este necesară pentru inducerea calusogenezei, tipul și concentrația acestora, variind de la o specie la alta, dar răspunsul morfogenetic al explantelor depinde și de nivelul endogen ale fitohormonilor din plante. Auxinele au rol foarte important asupra regenerării plantelor de grâu, orz și triticale. S-a demonstrat că auxina exogenă în concentrații majore inhibă creșterea rădăcinilor [244; 258].

Analizând mai multe surse bibliografice s-a concluzionat, că până în prezent au fost optimizate mai multe medii pentru regenerare la culturile cerealiere, prin suplinirea mediului de cultură cu citochinine: kinetina, 6-benzilaminopurină (BAP), tidiazuron (TDZ), zeatina (6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purină) împreună cu auxinele acid 3-indolilacetic (AIA), acid alfa naphtilacetic (ANA), 2,4-D și picloram [22; 63].

Calusurile cu zone morfogene au fost transferate pe mediu pentru regenerare MS suplimentat cu: AIA (0,5 mg/l) şi BAP (1 mg/l). Această variantă de mediu a fost selectată pe baza datelor din literatura de specialitate care menţionează faptul, că adaosul de AIA şi BAP induce morfogeneza și stimulează creșterea și dezvoltarea lăstarilor la grâu și triticale [173]. Similar, şi alţi autori au raportat o frecvență de regenerare de până la 94% pe mediul de regenerare care conține AIA (0,5 mg/l) plus BAP (1 mg/l) la 17 soiuri de *T. aestivum* și 3 soiuri de *T. durum* din embrioni maturi [342].

La fiecare 3 săptămâni, calusul embriogen a fost subcultivat pe medii nutritive proaspete. Regenerarea lăstarilor este un alt pas crucial după inducerea calusului în cultura tisulară. Între variantele experimentale s-au atestat diferenţe de la 0 până la 15 lăstari formaţi per explant iniţial (Anexa 1). Este important de menţionat, că în timpul cultivării *in vitro* nu toate centrele meristematice au evoluat în lăstari.

Reducerea semnificativă a numărului de lăstari regeneraţi poate fi cauzată de un şir de factori endogeni și exogeni, numărul subcultivărilor, condiţiile de cultură şi vârsta calusului. Inhibarea dezvoltării lăstarilor s-a atestat, de regulă, după a 5-a subcultivare.

Conform datelor obținute, frecvenţa regenerării lăstarilor per calus embriogen a fost de 17,27 - 43,27% (Tabelul 3.5). Cea mai sporită capacitate de formare a lăstarilor s-au atestat la genotipurile CAD 2/917, Ingen 33 şi Colina, iar la genotipurile LT 76872 şi Rodlen fiind minime. Cota majoră a prezentat genotipul CAD 2/917, constituind 13,66 lăstari per calus. Rata redusă s-a atestat la genotipurile LT 76872, constituind 2 lăstari şi Rodlen fiind în mediu 3 lăstari per explant (Figurile 3.6 și 3.7).



Fig. 3.6. Apariţia şi dezvoltarea lăstarilor per calus.

Rezultatele obţinute demonstrează cert dependența proceselor de formare și dezvoltare a lăstarilor de origine calusogenă de genotip și mediu nutritiv sau balanţa hormonală, precum și condiționarea organozenezei, cale parcursă de un număr mare de calusuri morfogene, ce a rezultat în special cu rizogeneza și excluderea posibilității de a obține plante.

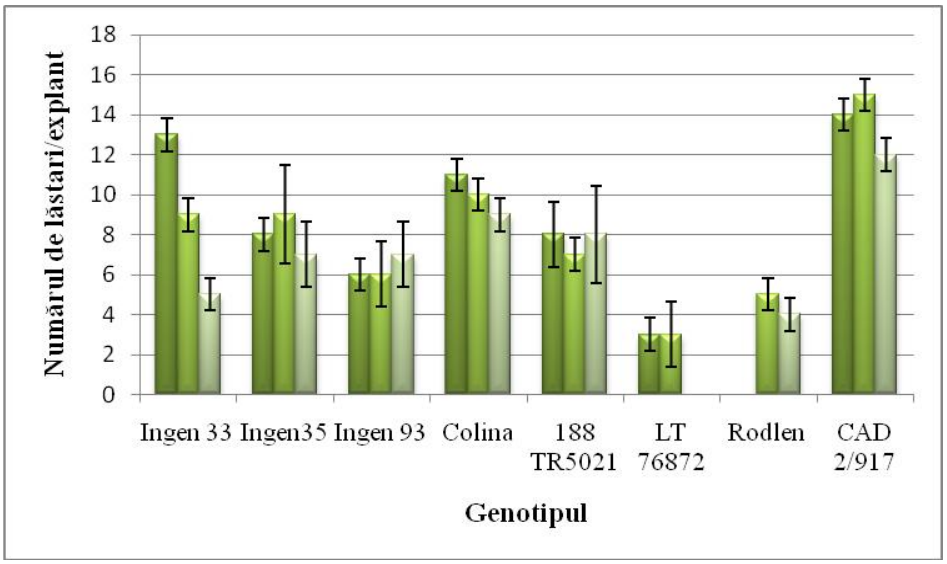


Fig. 3.7. Influenţa genotipului asupra numărului de lăstari regeneraţi.

În cultura *in vitro*, se presupune că auxinele exogene în funcție de concentrație favorizează rizogeneza. Creșterea rădăcinilor adventive s-a indus cu adăugarea în mediul de cultură a auxinelor în concentraţii mici, pe când concentrațiile mari inhibă controlul auxinei endogene în plante [244]. Pentru inducerea sistemului radicular acidul alfa naphtilacetic ANA s-a dovedit a fi deosebit de benefic în cazul triticalelor, stimulând formarea rădăcinilor și a elongării lăstarilor în părțile axiale ale plantelor, fapt confirmat și de alți autori [178].

În scopul înrădăcinării regeneranţilor, lăstarii cu lungime de 2,5 - 4,0 cm au fost decupaţi de la suprafaţa calusului și transferaţi pe mediul de înrădăcinare MS cu adaos de ANA (1 mg/l). Înrădăcinarea lăstarilor s-a atestat la a 10-cea zi de cultivare. Rata medie de înrădăcinare a lăstarilor a constituit 72,39%. Frecvenţa maximă de înrădăcinare s-a evidenţiat la CAD 2/917 fiind de 84,5%, iar cea minimă la genotipul Ingen 93, constituind 61,43% (Tabelul 3.5).

O deosebită importanţă trebuie acordată momentului transferării plantulelor din condiţiile *in vitro*, în condiţii naturale de viaţă, precum şi modului în care se realizează această trecere, prin aclimatizarea treptată a plantulelor. În acest scop, plantele cu un sistem radicular bine dezvoltat au fost transferate în vase cu substrat sol - turbă (3:1) pentru aclimatizare la condiţii *ex vitro*. În faza de aclimatizare somaclonele au manifestat capacitate diferită de adaptare, care în medie a fost 62,42 %. După aclimatizare plantele au fost transferate în ghivece şi cultivate în condiţii de laborator până la formarea spicelor.

Tabelul 3.5. Capacitatea de regenerare și înrădăcinare a plantelor obținute din calus embriogen

Genotipul	Calus embriogen (%)	Calus regenerativ (%)	Lăstari înrădăcinaţi (%)
	Valoarea medie±ES	Valoarea medie±ES	Valoarea medie±ES
Ingen 33	61,11±2,94	41,65±7,59	72,38±7,44
Ingen 35	65,56±2,94	34,23±5,22	67,78±13,92
Ingen 93	53,33±1,93	29,25±2,41	61,43±18,57
Colina	71,11±2,22	38,93±1,97	76,67±1,67
188TR 5021	62,22±2,22	32,22±1,11	64,44±9,87
LT 76872	43,33±5,77	17,27±3,84	75,00±25,00
Rodlen	56,66±3,33	18,85±3,07	75,00±25,00
CAD 2/917	82,22±1,11	43,28±1,72	84,50±3,58

Analiza dispersională a datelor obţinute, denotă o influenţă semnificativă a genotipului în stabilirea unui răspuns calusogenetic pozitiv (P≤0,001), puterea de influenţă constituind 86,22%, capacitatea de regenerare a lăstarilor per explant, manifestând o putere de influenţă mai mică fiind de 73,17% cu diferenţe semnificative pentru P≤0,05 (Tabelul 3.6).

Analiza varianței a făcut posibilă identificarea factorilor semnificativi care influențează calusogeneza, morfogeneza și regenerarea [4; 7]. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele din literatură, conform cărora frecvența calusogenezei, de regulă, depinde de un număr mare de factori [224].

Tabelul 3.6. Analiza varianţei şi contribuţia genotipului asupra frecvenţei calusogenezei şi regenerării (testul ANOVA)

Proces	Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	Puterea de influență (PI), %
Calusogeneza	Genotipul	2872,33	7	410,33	14,30***	86,22
	Rezidual	459,14	16	28,69		
	Total	3331,47	23			
Regenerarea	Genotipul	2012,12	7	287,44	6,23*	73,17
	Rezidual	737,91	16	46,11		
	Total	2750,04	23			

Notă: *, *** - semnificative pentru P≤0,05; P≤0,001.

Comparând contribuția diferiților factori și interacțiunea acestora, remarcăm faptul că genotipul joacă un rol semnificativ nu numai pentru procesul de calusogeneză, dar determină și capacitatea de regenerare. În temeiul acestor constatări a fost argumentată oportunitatea selectării și includerii în studiile ulterioare a genotipurilor de triticale de interes prioritar practic.

Observaţiile fenologice efectuate asupra regeneranților de triticale, au vizat indici morfologici, precum structura paiului, forma frunzelor şi spicului, structura inflorescenţei, inclusiv parametri morfometrici- talia plantei, numărul de noduri şi internoduri (Figura 3.8).

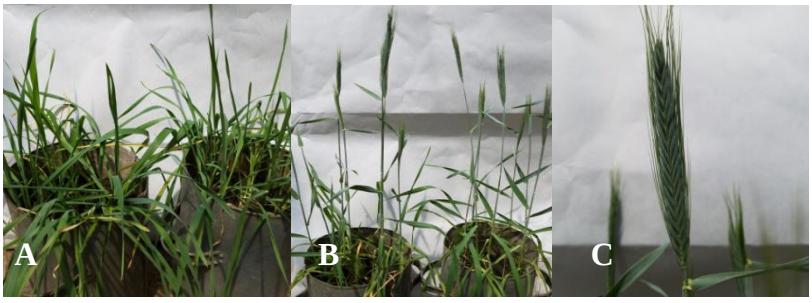


Fig. 3.8. Somaclone de triticale la diferite faze de creştere: A – faza de vegetație - înfrățire, stadiul de vegetație - tulpina principală + 2 - 4 frați; B, C – faza de vegetație - înspicat, stadiul de vegetație - 20% din inflorescență vizibilă.

În rezultatul evaluării somaclonelor de triticale s-au evidenţiat unele schimbări ale aspectului morfologic: la primul nod s-au format mai multe frunzuliţe (8 - 9); distanţa mică între noduri; spice cu ariste scurte, în timp ce în structura paiului nu s-au atestat schimbări.

3.1.4. Variabilitatea indusă de cultura *in vitro* la celulele calusale în baza frecvenței și spectrului aberațiilor cromozomiale

Dezvoltarea teoriei și elaborarea unor metode eficace noi de ameliorare a plantelor necesită cunoașterea profundă a modului de organizare și mecanismelor ce determină spectrul variabilității genetice [100].

Cultura calusului este un pas important pentru transformarea genetica a plantelor. Diverse studii au demonstrat apariția variabilității citogenetice și genetice la plantele regenerate din culturi de calus. Apariția unor aberații mitotice în culturile de țesuturi vegetale este bine cunoscută [105; 192], o parte din variația culturilor de țesut vegetal, în special în culturile de calus, fiind atribuită aberațiilor mitotice [191].

Un obiectiv important al studiilor realizate a inclus evaluarea regularităților dividerilor mitotice și evidențierea frecvenței și spectrului de aberații mitotice în condițiile de cultivare *in vitro* selectate pentru genotipurile de triticale analizate. Evaluarea dividerilor mitotice a celulelor calusale a avut la bază evidențierea cotei celulelor cu aberații cromozomiale, stabilirea spectrului

de mutații și aprecierea indicelui mitotic, parametri de bază în aprecierea regularității proliferărilor celulare [176].

Pentru analiza citologică a celulelor a fost necesară stabilirea termenului optim pentru fixarea materialului biologic, ceea ce a fost realizat conform recomandărilor din literatură [65]. În acest scop calusurile obținute din embrioni maturi de triticale au fost fixate la termene diferite de cultivare de la începutul inițierii calusogenezei (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Determinarea termenului optim de fixare a probelor de calus pentru studii citologice

Durata cultivării după pasaj de la inițierea calusogenezei	Numărul de celule în mitoză
8 ore	-
24 ore	4
48 ore	22
96 ore	95
192 ore	265

Este cunoscut faptul, că numărul de celule în diviziunea mitotică depinde de termenul de cultivare și este dependent de durata ciclului celular și condițiile de cultivare. Analizând calusul fixat la 8 ore de cultivare *in vitro* au fost observate un număr redus de celule în mitoză. Odată cu creșterea timpului de cultivare, numărul de celule mitotice a crescut treptat. La probele de calus fixate la 192 de ore (8 zile) s-a evidențiat număr maxim de celule calusale în diviziunea mitotică, constituind 265 per 893 de celule calusale analizate.

Totodată, în rezultatul examinării celulelor calusale la diverse termene de cultivare *in vitro* s-au evidențiat diferențe majore ale aspectului morfologic al celulelor evidențiate. Pentru calus sunt caracteristice diferite tipuri de celule, descrise anterior și de alți cercetători. Menéndez-Yuffá A. și coaut. [213] au descris calusul format din explante de frunze de cafea (*Coffea arabica*), unde au raportat următoarele tipuri de celule: celule „nedivizabile” cu nuclee mici, celule meristematice, care sunt cu citoplasmă dens colorată și un nucleu proeminent cu cromatina condensată și *celulele parenchimului*, care sunt mari și alungite. În studiile noastre a fost descrisă o eterogenitate pronunțată a celulelor calusale. S-au depistat celule de dimensiuni diferite: mari sau mici, cu formă neregulată sau foarte alungite, cu nuclee mari sau mici (Figura 3.9).

Datele din literatură atestă, că o influență semnificativă asupra potențialului de variație cromozomială în cultura *in vitro* la triticale o au genotipul și nivelul ploidiei. S-a demonstrat că calusul de triticale derivat din plante cu diferite niveluri de ploidie (hexaploid sau octaploid) diferă între ele în ceea ce privește nivelul de instabilitate cromozomială [140].

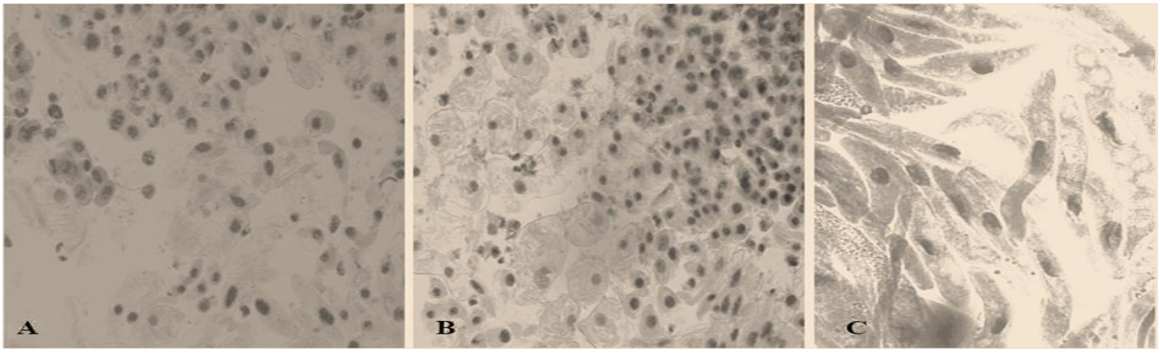


Figura 3.9. Heterogenitatea celulelor calusale de triticale (192 ore de cultivare după pasaj de la inițierea calusogenezei): A – celule mari, mici, alungite; B – celule mari; C – celule alungite (fusiforme) (x200).

Indicele mitotic reprezintă cota celulelor aflate în diviziune din numărul total de celule analizate și reflectă reacția genotipului la acțiunea diferitor factori, fiind un criteriu important în aprecierea proliferării celulelor. S-a stabilit, că activitatea mitotică a celulelor calusale *in vitro* este dependentă de genotip [8]. S-a determinat o activitate mitotică în toate fazele diviziunii mitotice la genotiprile: Ingen 35, Ingen 93, Colina, 188TR 5021, Rodlen și CAD 2/917, indicele mitotic constituind 13,58 - 55,04%. Pentru genotipul Ingen 33 analiza activității mitotice a atestat celule în interfază, profază, metafază și anafază, indicele mitotic fiind de 27,41%. La genotipul LT 76872 s-au observat preponderent interfaze.

Analiza procesului de diviziune a celulelor din calus a evidențiat aberații cromozomiale în ana-telofaze, frecvența acestora crescând de la 6,25 - 12,5%. Cota cea mai mare a fost estimată la genotipul Rodlen (Tabelul 3.8).

Numărul celulelor cu aberaţii cromozomiale în masa calusală la genotipul Rodlen a constituit 12,5 %, având cel mai mare număr de celule cu aberații, iar la genotipul Ingen 93 și CAD 2/917 acest indice a atins valoarea de 6,89% - 9,53 % respectiv.

Tabelul 3.8. Analiza activității mitotice și cotei celulelor calusale cu aberații

Genotip	Număr de celule studiate	Interfază	Profază	Metafază	Anafază	Telofază	Cota celulelor cu aberații (%)	Valoarea IM (%)
Ingen 33	124	90	18	14	2	-	-	27,41
Ingen 35	82	46	20	10	5	1	6,25	43,90
Ingen 93	200	128	39	18	5	6	6,89	34
Colina	113	90	16	4	2	1	-	20,35
188 TR 5021	95	62	19	12	1	1	-	34,73
LT76872	85	85	-	-	-	-	-	-
Rodlen	81	73	3	1	4	3	12,5	13,58
CAD 2/917	109	48	39	12	7	2	9,52	55,04

Deci, cultura *in vitro* influențează procesul de diviziune celulară, prin reducerea indicelui mitotic şi generarea de aberaţii cromozomiale depistate în anafaza-telofaza, la genotipul Rodlen, numărul de celule cu aberații fiind maxim (Figurile 3.10 și 3.11).

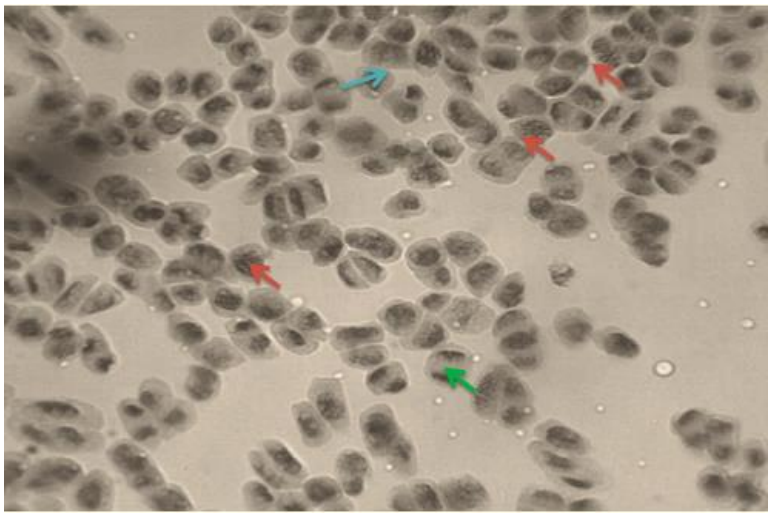


Fig. 3.10. Celule calusale în diverse faze mitotice: profază (săgeată roșie), anafază (săgetă albastră), telofaza (săgeată verde) (x320).

Cultura *in vitro* induce mutații în anafază-telofază de tipul: celule binucleate, dispunerea ciclică a cromozomilor, fragmente cromozomiale punctiforme (Figura 3.12), ce derivă din instabilităţile procesului de mitoză în celulele calusale şi care pot fi transmise regeneranților.

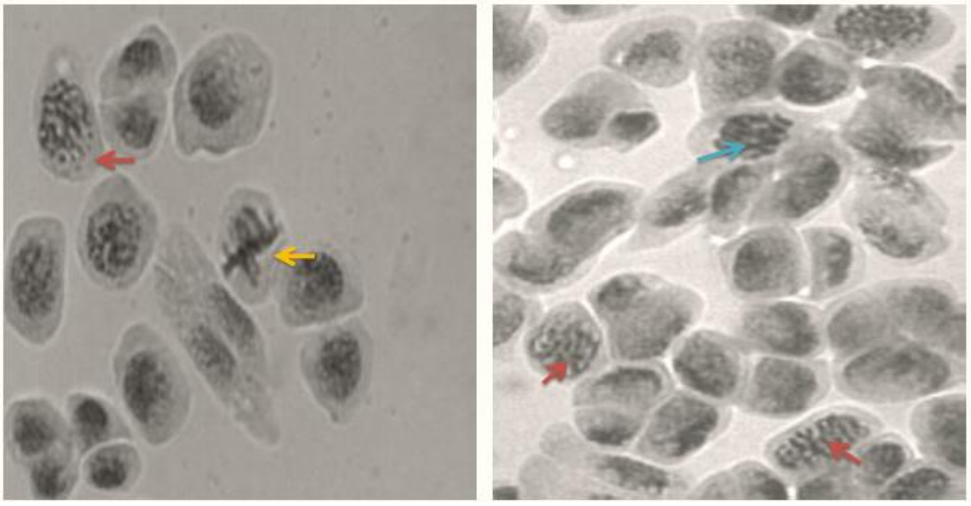


Fig. 3.11. Celule calusale în diverse faze mitotice: profază (săgeată roșie), metafază (săgeta galbenă), anafază (săgetă albastră) (x400).

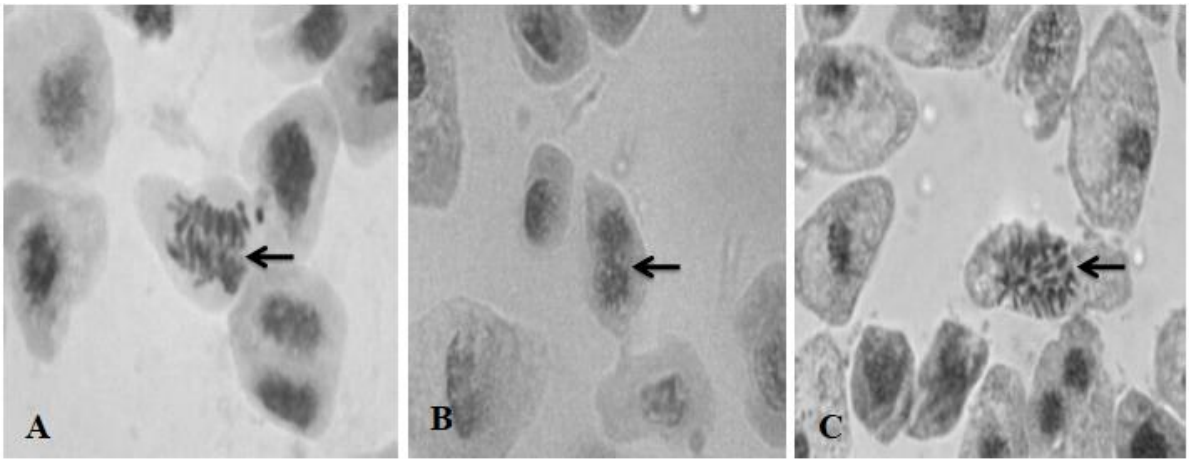


Fig. 3.12. Mutații mitotice în celulele calusale: A – anafază cu un fragment cromozomial; B – celulă binucleată; C – dispunerea ciclică a cromozomilor (x 500).

Prezența unor anomalii cromozomiale în culturile de calus de porumb poate fi explicată prin apariția întârziată a separării cromatidelor în anafazele mitotice [31]. Condițiile de cultivare *in vitro* afectează stabilitatea mitotică, astfel variabilitatea numărului și structurii cromozomilor este mai frecventă în culturile de celule sau țesuturi vegetale, decât în mediul natural. Se consideră, că variațiile citogenetice sunt mai frecvent întâlnite în culturile de calus decât în alte tipuri de cultură, deoarece formarea calusului implică o fază de dediferențiere urmată de o diviziune celulară necontrolată. O caracteristică comună a celulelor calusului este poliploidizarea lor, care a rezultat din diferite procese precum endoreduplicarea, endomitoza, fuziunea nucleelor și tulburările cromozomiale în timpul anafazei [65]. Cu toate acestea, variația genetică la nivel cromozomial este observată și la plantele regenerate prin metode de cultivare *in vitro* [113].

Distribuirea normală a materialului genetic în procesul diviziunii mitotice este substanțial modificată în urma apariției unor aberații în procesul de replicare, separarea cromatidelor surori sau segregare, care de regulă sunt provocate de rearanjarea ADN-ului, cu sau fără schimbarea numărului de cromozomi, precum și anomaliile structurale ale cromozomilor ce conduc la modificarea dimensiunii relative a acestora, poziției centromerului [88].

Gokhale M. și coaut. [131], studiind arborele *Oroxylum indicum* L.Vent., au demonstrat că celulele calusului au prezentat variații substanțiale (33%) în comparație cu somaclonele regenerate direct (25%), reprezentate prin celule tetraploide și aneuploide.

Utilizând citometria în flux, s-a înregistrat, că plantele de *Curcuma aromatica* Salisb. regenerate din calus (inițiat din lăstari) au fost în mare parte diploide (75,22%), și doar 24% dintre ele au fost parțial diploide (himere). Analiza conținutului de ADN a confirmat prezența celulelor diploide, tetraploide și octoploide [222].

Studiile citogenetice care investighează variațiile somaclonale obținute prin culturi *in vitro* a culturilor de calus și protoplaști confirmă constatările, că numărul cel mai mare de anomalii cromozomiale include cu predominanță poliploidia, urmată de aneuploidii. Aceasta se explică prin faptul că regeneranții obținuți trec prin mai multe mitoze în timpul cărora apar numeroase mutații necontrolate și spontane. Mutațiile sunt condiționate și de numărul de subculturi, perturbând mecanismele de control al diviziunilor celulare. Mutațiile punctiforme sau genomice pot avea consecințe fenotipice, unele fiind asociate cu caractere utile din punct de vedere economic [100].

Culturile de calus menținute un termen îndelungat conduc adesea la o acumulare de modificări genetice, inclusiv poliploidizare. Astfel de modificări induc regenerarea plantelor himerice, poliploide sau chiar la pierderea potențialului regenerativ [65]. Numărul de cromozomi al celulelor din calusul primar este condiționat de cantitatea materialului genetic, această afirmație fiind confirmată de numeroase studii la cerealiere [263]. Cu toate acestea, pe parcursul subcultivării calusului apar modificări cantitative și structurale substanțiale ale cromozomilor [55]. O creștere semnificativă a ratei celulelor aneuploide (până la 11%) a fost observată în calusurile crescute în timpul primului pasaj, depășind de două ori valoarea martorului [216].

Este cert demonstrat, că stabilitatea citogenetică a calusului este una dintre premisele cheie pentru propagarea clonală *in vitro* eficientă într-o cultură de țesut vegetal și invocă importanța luării în considerare a factorilor inductori ai instabilității genetice.

3.2. Variabilitatea indusă de razele gama în cultura *in vitro* la triticale

Mutageneza prin radiații a devenit un instrument stabil în ameliorarea plantelor, fiind o modalitate simplă, rapidă și eficientă de a corecta defectele majore fără a le modifica identitatea inițială. Soiurile mutante obținute îmbunătățesc biodiversitatea culturilor și oferă material de selecție util pentru ameliorarea ulterioară a culturilor [77; 288; 316]. La nivel global, mutageneza indusă a dezvoltat cu succes sute de soiuri mutante importante din punct de vedere agroeconomic [268]. Până în prezent, aproximativ 3406 de soiuri mutante a peste 225 de culturi au fost dezvoltate prin mutageneză indusă și au fost înregistrate în Baza de date, privind soiurile mutante (MVD) FAO/IAEA, Agenția Internațională pentru Energie Atomică, Viena, Austria [107].

Grupul de plante care a beneficiat cel mai mult de pe urma aplicării radiomutaţiilor în ameliorare sunt cerealele, constituind 47%. S-au obţinut soiuri cu talie mai redusă a plantelor, mai precoce, rezistente la boli, înfrăţire mai bună, cu spice mai mari şi număr ridicat de boabe pe spic, calitate boabelor ș.a. [268].

Radiațiile ionizante sunt cel mai frecvent utilizate pentru a genera mutații utile la plante datorită facilității de aplicare și frecvenței sporite de obținere a mutațiilor, ce pot provoca daune directe sau indirecte plantelor. Efectul direct provoacă deteriorarea materialului genetic (ADN sau ARN) din celulele organismului, rezultând modificări structurale și funcționale ale moleculelor de ADN [150].

Dintre sursele de radiație, razele gama sunt foarte importante în reproducerea mutațiilor și mutageneza *in vitro* pentru diversificarea caracterelor de interes la plante și extinderea variabilității genetice. Tehnicile biotehnologice *in vitro* garantează calitatea și siguranța, care, combinate cu mutageneza, permit selectarea unor caractere agronomice performante de importanță economică [280]. Numeroase studii, privind utilizarea razelor gamma în combinație cu diferite medii de cultură în rezultat au demonstrat, că plantele au suferit modificări morfologice, cum ar fi culoarea boabelor, culoarea florii și înălțimea plantei [40; 151].

Mutageneza în culturile de țesuturi și celule *in vitro* oferă oportunitatea răspândirii rapide și masive a plantelor mutante [307]. Inducerea mutațiilor prin utilizarea radiației gama a fost descrisă atât în apexuri și semințe colectate în câmp, precum și în culturi de țesuturi, protoplaști și calus. Cultura *in vitro* în combinație cu radiațiile a devenit o metodă eficientă pentru a induce variabilitatea genetică și multiplicarea rapidă a mutanților selectați, deoarece poate fi generată o cantitate suficientă de material pentru mutageneză și manipularea post-mutageneză [314].

În cadrul cercetărilor efectuate s-a constatat, că în condiții de cultură *in vitro*, radiația gama influențează frecvența calusogenezei, morfogenezei și regenerării.

În baza analizei dispersionale bifactoriale s-a stabilit, că puterea de influență a radiației gama este dependentă de genotip și specifică fiecărei etape: de obținere a țesuturilor calusale, embriogenezei și regenerarea de plantule.

3.2.1. Efectul dozelor razelor gama în procesul mutațional declanșat în celulele calusale

Razele gama sunt o sursă de mutageni care pot induce mutații la plante. Mai mulți cercetători folosesc razele gamma pentru a îmbunătăți caracterele de interes prin asigurarea diversității genetice. Studiile au demonstrat efectele iradierii gama asupra germinării semințelor, creșterii și dezvoltării plantelor, conținutului de clorofilă, stresului oxidativ și producției de metaboliți secundari. Este cunoscut faptul, că iradierea cu raze gamma în doze mari influențează negativ însușirile fiziologice și biochimice ale plantelor [165; 280]. Cu toate acestea, radiosensibilitatea ar putea identifica diferite nivele de susceptibilitate, în funcție de varietatea

plantei, datorită diferențelor legate de conținutul de ADN, procesul de reparare, reacția antioxidantă și cinetica ciclului celular [75]. Pentru a spori eficiența reproducerii mutațiilor, este importantă selectarea dozei optime de radiații care ar putea contribui la creșterea frecvenței mutațiilor fără a afecta în mod semnificativ supraviețuirea și reproducerea plantei. Majoritatea studiilor s-au concentrat pe evaluarea răspunsurilor biologice la diferite doze de radiație [150].

Rezultatele studiului radiosensibilității plantelor, prin utilizarea razelor gama, denotă dependența de faza de dezvoltare a plantei sau componentelor ei la momentul iradierii, starea fiziologică a organismului, intensitatea dozei utilizate. S-au stabilit corelații directe a efectelor radiației în dependență de specie, soi sau clonă. Tendința generală în acest aspect constată, că cu cât celula sau grupul de celule se află într-o stare mai avansată din punct de vedere al activității sale fiziologice, cu atât radiorezistența lor este mai scăzută.

Dozele de iradiere depind de țesutul plantei cercetat: semințe, calus, suspensii celulare, protoplaste și microspori, frunze, lăstari, meristeme apicale, muguri axilari, rădăcini și tuberculi obținuți prin cultura *in vitro,* cât și de stadiul de dezvoltare a plantelor [284]. Cel mai frecvent, iradierea cu raze gama este efectuată la cultura calusului, deoarece celulele sunt cu potențial proliferativ înalt (zone cu diviziune intensă a celulelor), fiind mai sensibile la radioactivitate în comparație cu celulele adulte [42]. Utilizarea iradierii gama a materialului semincer în agricultură este limitată din cauza incertitudinii în dozajul iradierii care variază pentru diferite culturi. Cu toate acestea, tratamentul cu scopul de inducere a mutațiilor este convenabil, deoarece cantități mari de embrioni pot fi iradiate într-o singură repriză [101].

În vederea aprecierii relațiilor doză/efect a razelor gama la triticale asupra boabelor diferitor genotipuri au fost aplicate 7 doze – 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 Gy. După iradiere, embrionii maturi au fost sterilizați, apoi excizați de la cariopsă și inoculați pentru inducerea calusului pe mediul de cultură bazal MS suplimentat cu 2,4-D 2,5 mg/l și kinetină 0,2 mg/l.

Inițierea calusogenezei s-a observat la a 4 - 5-a zi de la inoculare la toate variantele investigate (Figura 3.13). S-a constatat, că radiațiile gama în limitele dozelor 50 - 150 Gy a avut un efect stimulator asupra creșterii calusului. Asemenea efect poate fi determinat de modificarea procesului de expresie și interacțiune a produselor genelor modificatoare, care în mod normal inhibă unele procese fiziologice, spre exemplu permeabilitatea membranelor [150]. Se consideră că stimularea cu radiații în doze mici favorizează inducerea metaboliților și modificări biochimice implicate în regenerarea plantelor, generând astfel plante himerice [280].

Analiza frecvenței calusogenezei în baza valorilor medii a atestat variație semnificativă la nivel de 95 - 99,9%, fiind dependentă de genotip și factorii luați în studiu. S-a constatat, că doza de 50 Gy a avut efect stimulator pentru proliferarea calusului la genotipurile Ingen 93, Ingen 35,

Colina și CAD 2/917, valorile variind de la 53,74 - 76,13 % în comparație cu martorul. Valorile medii pentru genotipurile Ingen 33, 188TR 5021, LT 76827 și Rodlen au fost mai mici decât la martor de 1,1 - 2,14 ori, fiind semnificative la nivel de 99 - 99,9%.

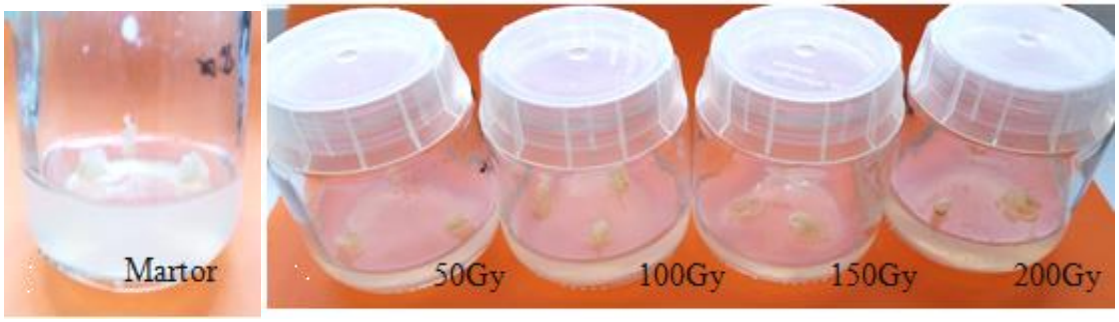


Fig. 3.13. Inițierea calusogenezei din embrioni maturi la martor și diferite doze de iradiere.

Este important de remarcat faptul, că pentru dozele de iradiere 75 - 125 Gy s-a estimat o creștere ușoară a valorilor medii în comparație cu martorul la majoritatea variantelor luate în studiu. Pentru genotipul CAD 2/917 doza de 100 Gy a condiționat creșterea semnificativă la nivel de 95% a frecvenței calusogenezei de 1,07 ori față de martor. Pentru variantele 188TR 5021 și Rodlen valorile medii au crescut față de doza de 50 Gy, dar nu au depășit martorul. Rezultatele unor cercetători au stabilit că o iradiere a explantelor cu doze scăzute de radiaţii gama, poate îmbunătăţi semnificativ regenerarea de plantule sau formare de embrioni somatici şi de haploizi. Au fost obținute 10 linii mutante de linte prin iradierea semințelor cu raze gamma de la 100 până la 300 Gy [268]. Radiația gama cu doza de 200 Gy a îmbunătățit compușii flavonoizi în 37 de linii de grâu [142].

La doza de 75 Gy valoarea medie a cotei explantelor cu răspuns pozitiv a fost de 1,5 - 2,02 ori în comparație cu martorul, iar pentru doza de 100 Gy - de 1,47-1,63 ori, și 125 Gy - de 1,26 - 1,53 ori, datele fiind semnificative la nivel de 99,9%. O reacție specifică s-a remarcat la genotipul LT 76827, radiația gama având un efect inhibitor asupra proliferării calusului, constatând că odată cu creșterea dozei de iradiere valorile medii scad în comparație cu martorul de 1,47 – 2 ori, semnificative la nivel de 99,9%. Astfel, impactul radiației la toate dozele de iradiere a avut un efect inhibitor pentru acest genotip.

Efectul radiației gama (150 Gy) asupra calusogenezei a atestat valori, ce variază de la 58,19 - 85,55% în comparație cu martorul pentru genotipurile: Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Colina și CAD 2/917. Deci, s-a evidențiat o reacție specifică a fiecărui genotip la acțiunea razelor gama la doza de 150 Gy. Astfel, pentru genotipurile 188 TR5021, Rodlen și LT 76827 s-au atestat valori medii mai mici de 1,26 - 1,99 ori față de martor, fiind semnificative la nivel de 99,9%, dar cu o creștere a valorilor față de toate dozele de iradiere luate în studiu (Figura 3.14).

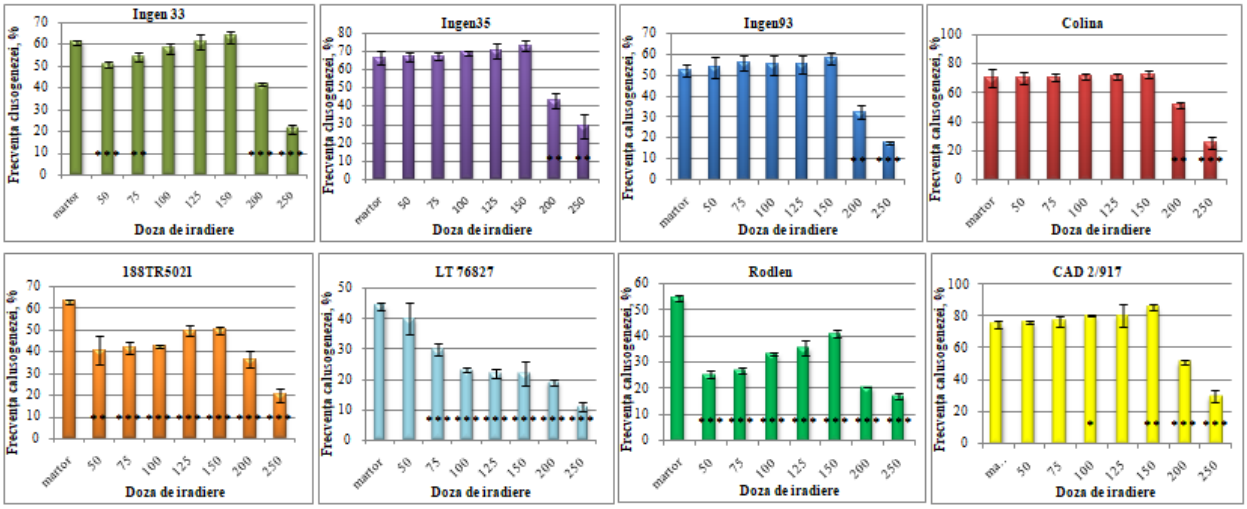


Fig. 3.14. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţia gama asupra frecvenţei calusogenezei.
Notă: *, **, *** - semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

În cercetările realizate de noi s-a atestat, că dozele de 200 - 250 Gy au avut efect depresiv asupra calusogenezei la triticale. Atât creșterea calusului, cât și formarea zonelor morfogene au scăzut odată cu creșterea nivelului de expunere la razele gama. Analiza frecvenței calusogenezei în baza valorilor medii a atestat variație semnificativă la nivel de 99 - 99,9%. La toate genotipurile s-a constatat acțiunea mai pronunțată a radiației gama asupra inițierii calusului, valorile fiind mai mici în comparație cu martorul. S-au înregistrat valori mai reduse în comparație cu varianta martor pentru doza de 200 Gy, constituind 19,15 - 51,3%, ceea ce este de 1,36 - 2,63 ori mai mici, iar doza de 250 Gy a indicat valori mai accentuate, de 2,26 - 3,97 ori mai mici față de martor. Datele experimentale au demonstrat, că la doza de 250 Gy, evoluția calusului se stopează și pe parcursul subcultivării se necrotizează. Se consideră că dozele mari de radiații pot induce radioinhibarea prin afectarea promotorilor de creștere care duce la distrugerea țesuturilor, provocând malformarea și pierderea capacității de regenerare [280]. Conform datelor din literatură estimarea dozei letale (DL 50) pentru semințele de triticale constituie 460 Gy [247].

Rezultatele aplicării testului ANOVA denotă, că asupra frecvenței calusogenezei au influențat semnificativ (P≤0,001) atât genotipul, radiația cât și interacțiunea genotip-radiație (Tabelul 3.9).

Determinarea radiosensibilității și dozelor optime de radiații ionizante sunt pași importanți pentru realizarea mutagenezei induse pentru îmbunătățirea culturilor. Numeroase studii au demonstrat, că dozele mari de radiații gama provoacă modificări fiziologice, cum ar fi întârziere în germinarea semințelor și reducerea ratei de supraviețuire și a creșterii plantelor la grâu [247].

Tabelul 3.9. Analiza varianţei frecvenței calusogenezei în dependență de doza de radiație gama și genotip

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Genotipul (G)	38100,4	7	5442,91	591,62***	50,44
Doza de radiație (DR)	29678,8	7	4239,82	460,85***	32,29
Interacţiunea G / DR	6564,79	49	133,97	14,56***	8,69
Rezidual	1177,61	128	9,20007	-	
Total	75521,6	191	-	-	

Notă: *** - semnificativ pentru P≤0,001.

Rezultatele sunt în concordanță cu cele ale cercetătorilor, care au raportat, că potențialul de germinare a semințelor a scăzut pe măsură ce doza de radiații a crescut. În plus, viteza de germinare a fost confirmată a fi redusă cu expunerea prelungită la raze gama chiar și la aceleași doze de radiații. Inhibarea creșterii și întârzierea sunt cunoscute a fi cauzate de oprirea ciclului celular în faza G_2 în timpul diviziunii celulare somatice expuse la radiații cu doze mari [150].

3.2.2. Impactul radiaţiei gama asupra acumulării masei calusale şi regenerării plantulelor

Este cunoscut faptul, că radiația gama influențează creșterea și dezvoltarea plantelor prin inducerea modificărilor morfologice, structurale și funcționale ale celulelor și țesuturilor. Cultura calusului poate fi considerată o etapă biotehnologică inițială importantă pentru producerea pe scară largă de biomasă și materie primă pentru culturile de suspensie celulară și regenerarea lăstarilor, fiind exploatată pentru acumularea de compuși activi [152].

Determinarea cineticii creşterii calusurilor s-a estimat prin cântărirea biomasei calusale neoformate la nivelul inoculilor, a greutăţii masei proaspete, la intervale de o luna de la subcultivarea primelor formaţiuni. Pasajele s-au efectuat pe medii proaspete MS cu același conținut de reglatori de creștere.

Observarea efectelor radiaţiei gama asupra inducerii şi dezvoltării calusului, atestă schimbări în creșterea, culoarea și morfologia calusului. Dozele de iradiere mai mici (50 - 150 Gy) au acționat asupra formării calusului în comparație cu formele martor, calusul fiind granular de culoare verde-gălbuie. La doza 200 Gy s-a atestat calus friabil alb cu puține zone meristematice, iar la doza 250 Gy se remarcă necrotizarea și stoparea evoluției calusului, de aceea din cercetările ulterioare a fost exclus. Doze mari de iradiere, conform datelor din literatură, conduc la inhibarea acumulării de biomasă calusală. Se consideră că motivul scăderii treptate a proliferării se poate datora efectului radiațiilor asupra activității factorilor de creștere endogeni, care stimulează diviziunea celulară [155].

Analizând efectul radiației gama la nivel de țesut, conform indicelui masa calusului, s-a constatat, că dozele 75 - 150 Gy au efect stimulator, în timp ce în cazul dozei 50 Gy la toate genotipurile luate în studiu se observă o diminuare a biomasei calusale în comparație cu martorul (Figura 3.15). Pentru genotipurile 188TR 5021, LT76872, Rodlen și CAD 2/17 valorile medii sunt mai mici cu 5,98 - 27,13% față de martor, semnificative la nivel 95 - 99%.

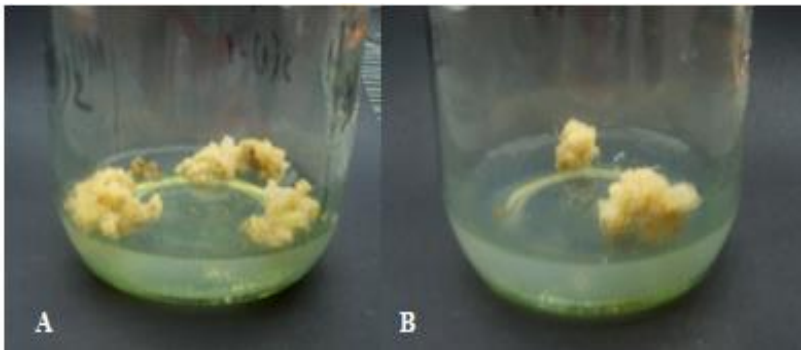


Fig. 3.15. Creșterea biomasei calusale a genotipului Ingen 35: A – varianta martor; B – varianta iradiată cu 50Gy.

Odată cu creșterea dozei de radiație se remarcă o creștere a biomasei calusale. Analizând rezultatele obţinute, s-a constatat că, genotipurile Ingen 33, Ingen 35, și CAD 2/917 supuse iradierii gama cu dozele de 125 Gy au o capacitate calusală mai mare decât varianta martor cu 0,71 - 8,36%, iar pentru genotipul LT 76872 media s-a redus cu 12,1% în comparație cu varianta matror, semnificativ 99%. Genotipurile Ingen 33, Ingen 35, CAD 2/917, Ingen 93 sunt caracterizate de o abilitate mai mare de formare a masei calusului, faţă de celelalte genotipuri studiate (Anexa 2).

Studiind dezvoltarea calusului s-a observat, că pentru acumularea biomasei calusale radiaţiile ionizante cu doza de 150 Gy a avut efect stimulator pentru majoritatea genotipurilor de triticale. Se atestă o corelaţie pozitivă între doza de iradiere şi masa calusului obţinut faţă de martor. La loturile tratate cu doza de iradiere 150 Gy masa calusului a crescut, prezentând diferenţe atât între martor, cât şi între celelalte variante experimentale. După 30 de zile de subcultivare genotipul CAD 2/917 (777,31 mg) a prezentat valoare maximă, fiind cu 12,42% mai mare ca martorul, semnificativ la nivel de 95%, cea mai mică valoare s-a stabilit la genotipul 188TR 5021, fiind nesemnificativă față de martor. Variația masei calusului cu doza de iradiere de 150 Gy pentru fiecare genotip studiat este reprezentată în figura 3.16. Astfel, cele mai mari valori au fost înregistrate de genotipurile Ingen 35, masa calusului constituind (879,57 mg), iar cele mai reduse date s-au atestat la genotipul LT 76872 (399 mg). Pentru varianta martor, greutatea medie a calusului a oscilat între 384,38 - 814,08 mg (Tabelul 3.16).

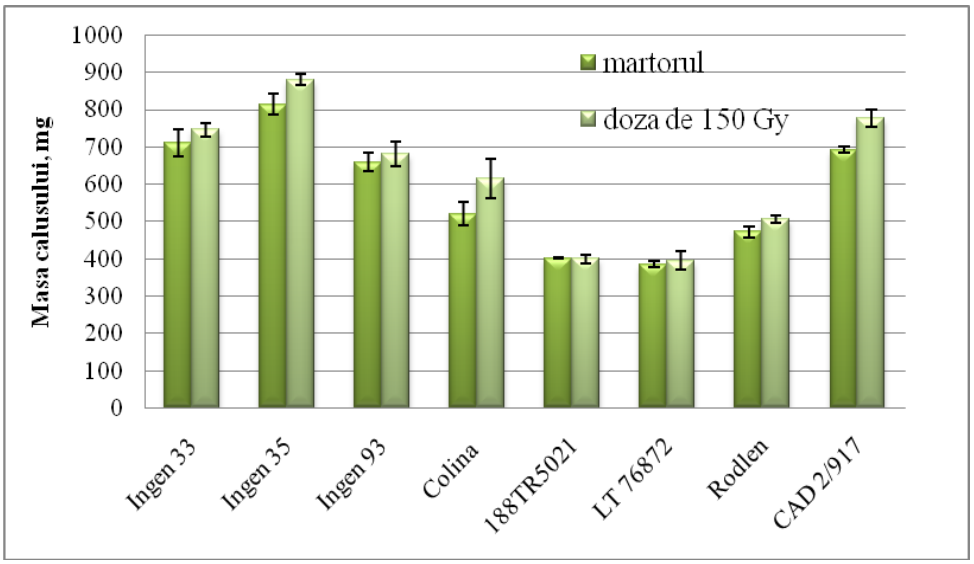


Fig. 3.16. Variația masei calusului în dependență de doza de iradiere 150 Gy în comparație cu martorul.

Conform cercetărilor efectuate s-a evidențiat o variație semnificativă a valorilor medii, care sunt dependente de genotip și doza de radiație [3]. Pentru determinarea impactului razelor gama asupra variabilității se utilizează coeficientul de variație (CV,%), care ne permite să stabilim reactivitatea genotipului față de factorul dat. Prin urmare, coeficientul de variație, pentru 150 Gy constituie 3,08 - 14,54%, ceea ce corespunde unui nivel mic și mediu de variabilitate. La varianta martor valorile coeficientului de variație fiind 0,61 - 10,79%.

Pe măsura creşterii dozei de iradiere 200 Gy, efectul razelor gama a diminuat creşterea biomasei calusale. Pentru genotipurile 188TR 5021, LT 76872, Rodlen și CAD 2/17, valoarea medie s-a micșorat cu 7,38 - 31,75% în comparație cu martorul, fiind semnificativă 95-99%. Rezultate similare au fost raportate în greutatea proaspătă a calusului la grâu și trestia de zahăr. Iradierea cu raze gama în doze mari provoacă leziuni severe ale țesutului, ceea ce poate reduce greutatea calusului [171].

În rezultatul totalizării studiului actual s-a stabilit, că doza de radiație 150 Gy a fost cea mai eficace în stimularea producției de biomasă a calusului. S-a confirmat cantitativ efectul radiaţiei asupra calusului embriogen și regenerării [3].

Din analiza rezultatelor nu se observă o dependență semnificativă între greutatea proaspătă a calusului şi rata de regenerare. Astfel, genotipul LT 76872 cu o greutate mică a calusului (395,40 mg), are o rată de regenerare de 1,2%, spre deosebire de genotipul Ingen 33 cu o greutate mai mare a calusului (745 mg), dar cu o rată a regenerării de 0,9 %. Cota cea mai mare în formarea calusului embriogen a prezentat genotipul CAD 2/917, constituind 48,2%, cu o rată de regenerare de 1,3% (Tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Regenerarea prin embriogeneză somatică a genotipurilor de triticale iradiate cu raze gama la doza de 150 Gy

Genotip	Greutatea calusului, mg	Calusuri embriogene (%)	Rata regenerării (%)
Ingen 33	745,08	10,0	0,9
Ingen35	879,57	30,3	1,4
Ingen93	681,07	37,9	1,3
Colina	615,07	44,0	1,1
188 TR 5021	399,00	26,6	0,8
LT76872	395,40	46,6	1,2
Rodlen	507,11	33,6	1,2
CAD 2/917	777,31	48,2	1,3

În urma prelucrării statistice, prin aplicarea testului ANOVA (Tabelul 3.11) s-a stabilit, că greutatea calusului a fost influenţată semnificativ de genotip, radiaţia gama, cât şi de interacţiunea lor (P≤0,05; 0,001). Puterea de influență majoră fiind atribuită genotipului 49,35%, urmată de radiația gama 25,54%.

Tabelul 3.11. Analiza varianţei masei calusului

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Genotipul (G)	482355,0	7	68907,85	425,03***	49,35
Doza de radiaţie (DR)	249665,0	6	41610,8	25,67***	25,54
Interacţiunea G/DR	63707,9	42	1516,9	0,94*	6,51
Rezidual	181580,0	112	1621,3	-	
Total	977307,9	167	-	-	

Notă: *, *** - semnificative pentru P≤0,05; 0,001

3.2.3. Influența razelor gama asupra proceselor morfogenetice

Fenomenul de totipotență a celulelor somatice vegetale face posibilă inducerea proceselor morfogenetice în cultura *in vitro,* care au ca rezultat formarea *de novo* a țesuturilor și organelor capabile să genereze un organism integru [376]. Se știe că morfogeneza este unul dintre cele mai complexe procese în cultura de țesut, în special pentru familia *Gramineae*. Rezultatele mai multor studii, au demonstrat condiționalitatea genotipică a dezvoltării morfogene [375]. Utilizarea radiaților gama ca agent mutagen fizic, ca sursă de sporire a variabilității somaclonale este unul din factorii ce asigură formarea unui calus embriogen cu regenerarea ulterioară.

Deoarece, calusul compact, globular de culoare verde a prezentat însușiri embriogene s-a calculat frecvența de formare a acestuia, fiind estimată frecvența morfogenezei. În rezultatul

analizei datelor obținute s-a evidențiat recția specifică a genotipului în complex cu doza de iradiere, care au influențat semnificativ frecvența morfogenezei.

Procesul de formare a zonelor morfogene în calusurile analizate a fost inhibat de către radiație la o parte din genotipuri. S-a stabilit, că pentru genotipurile Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93 și CAD 2/917 la dozele de 50 - 150 Gy valorile medii au crescut față de martor, cea mai mare valoare fiind la doza de 150 Gy de 1,05 - 1,39 ori, fiind semnificative la nivel de 95 - 99% (Figura 3.17).

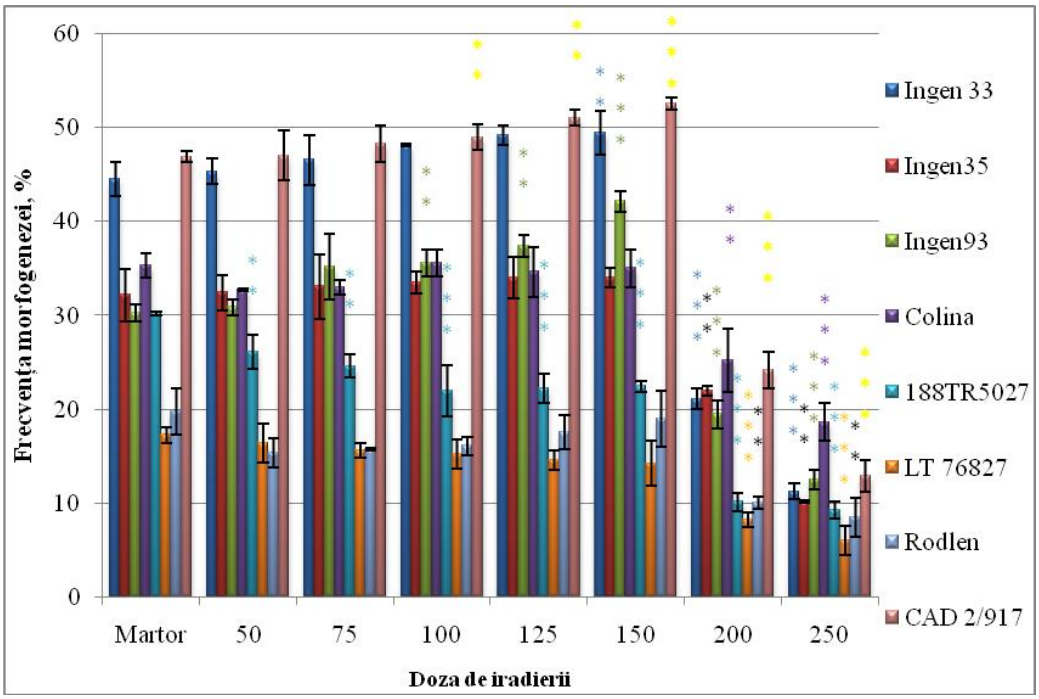


Fig. 3.17. Influența interacțiunii factorilor genotip-radiație gama asupra frecvenței morfogenezei.
Notă: **,*** - semnificative pentru P≤0,01; 0,001.

Genotipurile Colina, LT 76827 și Rodlen au atestat valori medii mai mici decăt martorul. S-a evidențiat genotipul 188TR 5021, valoare medie s-a redus în comparație cu martorul la toate dozele de iradiere de 1,15 - 3,27 ori, fiind semnificativă la nivel de 95 - 99,9%. S-au atestat diferențe semnificative (99 - 99,9%) cu 28,62 - 52,62% mai mici față de martor pentru toate genotipurile luate în studiu la doza de iradiere 200 Gy, iar pentru doza de 250 Gy valorile medii s-au redus substanțial în comparație cu martorul, constituind 47,30 - 74,82% (P≤0,01) (Anexa 3).

Astfel, iradierea cu 150 Gy a mărit valorile medii a frecvenței morfogenezei la toate genotipurile de triticale. La genotipurile Colina, 188TR 5021 și Rodlen se observa o ușoară intensificare a proceselor morfogenetice față de celelalte doze de iradiere, dar care nu depășește varianta martor (Figura 3.18).

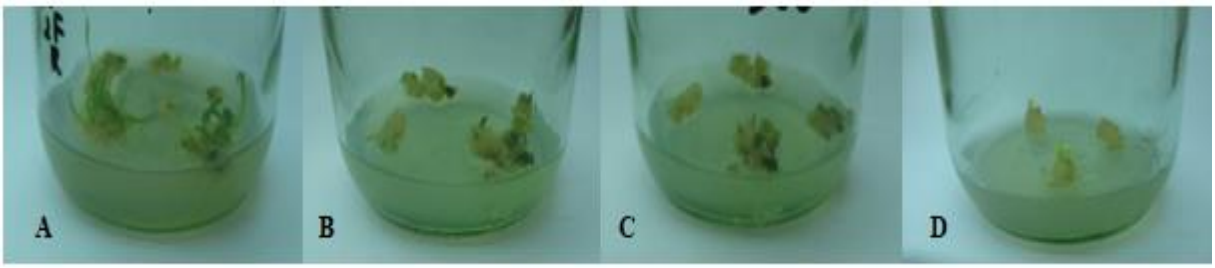


Fig. 3.18. Calus morfogen cu formarea lăstarilor la genotipul Ingen 93:
A – varianta martor; B – iradiere 100 Gy; C – iradiere 150Gy; D – iradiere 200 Gy.

Studiul analizei dispersionale a demonstrat, că asupra morfogenezei, influențează semnificativ (P≤0,001) genotipul cu o putere de influență de 53,70%, urmat de radiație 35,37%, iar interacțiunea factorului genotip-radiație constituie 9,80% (Tabelul 3.12)

Tabelul 3.12. Analiza varianței morfogenezei

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Genotipul (G)	18123,9	7	2589,13	882,57***	53,70
Radiația (R)	11936,9	7	1705,27	581,28***	35,37
Interacţiunea G/R	3309,8	49	67,55	23,02***	9,80
Rezidual	375,5	128	2,93	-	
Total	33746,0	203	-	-	

Notă: *** - semnificativ pentru P≤ 0,001

Rezultatele studiului realizat demonstrează complexitatea procesului de inducere a morfogenezei, condiționate de factori endo- și exogeni. Diferențele stabilite între diferite genotipuri și doze ale razelor gama au scos în evidență specificitatea radiosensibilității și polivalența procesului de diferențiere.

3.3. Obținerea regeneranților de triticale prin metoda *in vitro* și mutageneza fizică

Variațiile somaclonale obținute prin mutageneza *in vitro* cu radiații gama sunt lipsite de constrângeri de reglementare și permit regenerarea variațiilor genetice într-o perioadă scurtă de timp la costuri reduse, la care acest sistem asigură manipularea ușoară a explantelor în spații restrânse și controlate în condiții aseptice [294]. Efectul mutagenezei *in vitro* folosind ^{60}Co a fost utilizată pentru a extinde variația genetică în scopuri de reproducere a orezului (*Oryza sativa* L.) [27; 162], ghimbirului (*Zingiber officinale* Rosc.) [297], cartofului (*Solanum tuberosum.* L.) [220] și tomatelor (*Solanum lycopersicum* L.) [242].

Frecvența regenerării a fost estimată după numărul total de calusuri regenerative, indiferent de tipul de calus obținut în sistemele cercetate. Cercetările s-au axat pe elucidarea

efectului dozei de radiație, genotipului și interacțiunii factorilor genotip - radiație asupra frecvenței de regenerare [9].

Analiza rezultatelor a demonstrat, că factorii analizați au influențat semnificativ frecvența regenerării (P≤0,001) (Tabelul 3.13). Acțiunea maximă a înregistrat-o genotipul (50,33%), radiația gama (40,63%) și interacțiunea genotip - radiație (7,76%).

Tabelul 3.13. Analiza varianței frecvenței regenerarii de plantule

Sursa de variabilitate	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Genotipul (G)	16297,3	7	2328,19	730,61***	50,33
Doza de radiație (DR)	13157,7	7	1879,68	589,86***	40,63
Interacțiunea G/DR	2514,4	49	51,31	16,10***	7,76
Rezidual	407,9	128	3,19	-	
Total	32377,3	191	-	-	

Notă: *** - semnificativ pentru P≤0,001

Prin urmare s-a pus în evidență influența maximă a genotipului, care a reacționat specific asupra frecvenței regenerării. În rezultatul analizei datelor obținute cea mai mare valoare a acestui indice față de martor a fost remarcată la genotipul CAD 2/917 (43,05%) și Ingen 35 (42,88%), pentru doza de iradiere 150 Gy, diferențele fiind semnificative la nivel de 95-99%. Valoarea minimă pentru această doză de iradiere s-a atestat la genotipul LT 76827 (7,57%) și Rodlen (9,74%), semnificative la nivel de 99,9% (Figura 3.19).

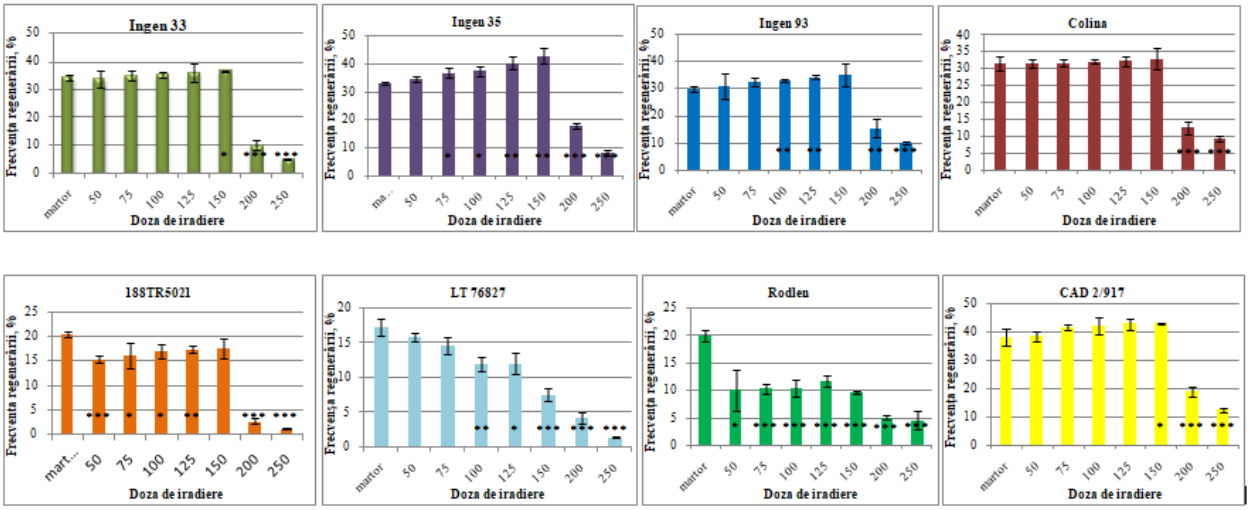


Fig. 3.19. Influența interacțiunii factorilor genotip - radiație asupra frecvenței regenerării.
Notă:*, **, *** - semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001

Analizând efectul radiației asupra capacității de regenerare s-a observat reacția diferită a genotipurilor. La doza de 150 Gy pentru genotipurile Ingen 33, Ingen 93, Colina și CAD 2/217 valorile medii s-au mărit, indicând cele mai mari valori cuprinse între 33,99 - 43,05%, în comparație cu martorul 29,76 - 38,22%. Genotipul Ingen 35 a prezentat o creștere a frecvenței de

regenerare, mai mare în comparație cu martorul și genotipurile luate în studiu, constituind 34,64 - 42,88%, pentru toate dozele de iradiere, fiind semnificative la nivel de 95 - 99%.

Acțiunea mai pronunțată a radiației a fost remarcată pentru Rodlen, fiind un genotip radio-mutant, ce a prezentat o reacție specifică asupra regenerării. Presupunem, că la acest genotip în urma iradierii repetate se provoacă o instabilitate genetică, procesul mutațional la nivel celular fiind mai exprimat, provocând aberații genetice (instabilitate cariotipică). Valorile medii au fost semnificative (95 - 99,9%) pentru toate dozele de iradiere, cu o ușoară creștere a valorii doar la doza de 125 Gy (11,68%), dar nu a depășit martorul (19,99%). Comparând varianta martor a genotipului LT 76827 cu toate dozele luate în studiu, se atestă reducerea valorilor medii cu 8,16 - 91,27% pentru dozele 100 – 250 Gy, fiind semnificative (95 - 99,9%). Frecvența regenerării s-a diminuat de 2,97 - 16,74 ori. Genotipul 188TR 5021 a indicat o micșorare a valorilor medii pentru doza 50 Gy, diferența fiind semnificativă la nivel 99,9%, apoi se observă o creștere ușoară până la doza de 150 Gy, semnificativă 95 - 99%, dar nu depășesc varianta martor. Cea mai semnificativă diferență (99,9%) a valorilor medii în raport cu martorul a fost înregistrată pentru doza de 250 Gy pentru toate genotipurile (Figura 3.19). Efectul dozelor mari de radiații gama a înregistrat răspunsuri cu valori minime ale regenerării și creștere redusă a plantelor, sugerând leziuni structurale induse de radiații.

În rezultatul cercetărilor s-a constatat, că efectul iradierii gama asupra procesului de formare a regeneranților a fost dependent de doza de radiație. Astfel, razele gama cu doza de 150 Gy au intensificat frecvența regenerării, pentru majoritatea genotipurilor, iar dozele de 200 – 250 Gy pentru toate genotipurile au redus acest indice în comparație cu martorul.

Calusurile au fost subcultivate la fiecare 3 săptămâni pe medii nutritive proaspete, iar cele ce prezentau zone morfogene au fost transferate pe mediu de regenerare MS suplimentat cu AIA (0,5 mg/l) şi BAP (1 mg/l). După 2 săptămâni s-a observat formarea lăstarilor, care ulterior au evoluat în plantule (Figura 3.20).



Fig. 3.20. Lăstari regeneraţi la diferite doze de iradiere și a martorului, după 30 zile.

Pe parcursul subcultivării s-a remarcat că o parte din calusuri nu au format muguri şi lăstari adventivi. S-au înregistrat urmări letale pentru o parte din calusuri, care morfologic se manifestă prin apariţia sectoarelor necrotizate pe suprafaţa ţesutului calusal şi a dus la pierderea capacităţii de morfogeneză, ceea ce denotă că razele gama stimulează procese litice ce provoacă necrotizarea ţesutului vegetal. În timpul cultivării *in vitro* nu toţi embrioizii au evoluat, parcurgând toate etapele de dezvoltare, unii rămânând în stadiile începătoare, fără a finaliza cu regenerare de plantule. Acest lucru explică impactul deosebit de semnificativ al radiaţiei asupra modificării indicilor activităţii morfogenetice, mai cu seamă a eficienţei de regenerare. Probabil, restructurările produse de radiaţia gama în ţesutul calusal conduc la inhibarea dezvoltării unei părți din embrioizii somatici.

În prezentul studiu, s-a constatat că rata de supraviețuire a explantelor iradiate scade liniar odată cu creșterea dozelor razelor gama. Efectele creșterii dozelor de radiație s-au reflectat și asupra apariției lăstarilor potențial mutanți. Numărul de lăstari cu cele mai semnificative valori, în mediu 7,25 per explant s-a stabilit pentru doza de iradiere 150 Gy.

În rezultatul analizei datelor, cele mai mari valori în ceea ce privește formarea lăstarilor a prezentat genotipul Ingen 35, constituind 14 lăstari per calus și CAD 2/917 cu 13 lăstari. Rata redusă s-a atestat la genotipurile LT 76872, constituind 1,5 lăstari per explant (Figura 3.21).

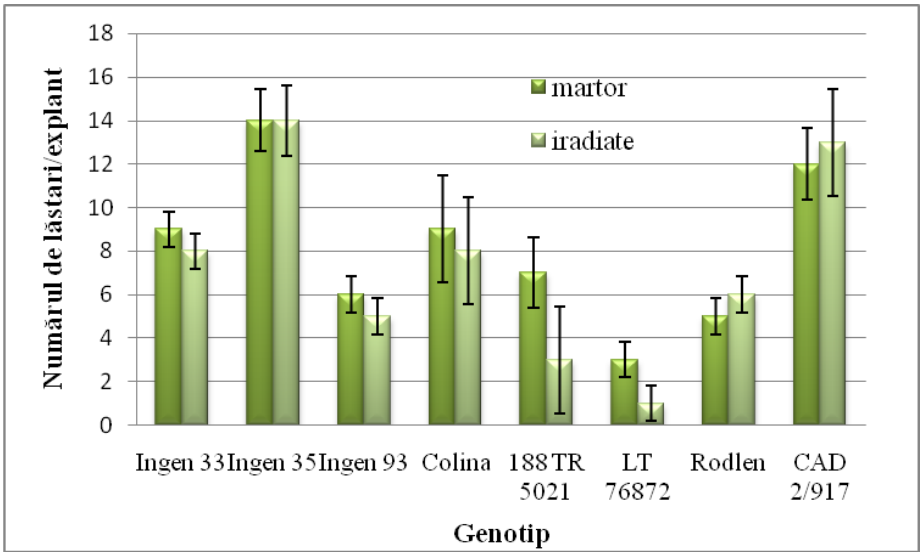


Fig. 3.21. Influența genotipului și a radiației gama (150 Gy) asupra numărului de lăstari regenerați.

Pentru genotipurile Ingen 33, Ingen 93, Colina, LT 76872 iradiate cu doza de 150 Gy, valorile medii s-au redus față de martor de 1,12 - 3 ori. Cele mai înalte valori fată de martor s-au atestat la genotipul Rodlen și CAD 2/917, media a crescut de 1,08 - 1,2 ori. Rata cea mai redusă

s-a înregistrat la genotipurile LT 76872, constituind 1,5 lăstari per explant. S-au obținut 58 de regeneranți mutanți.

Formarea regeneranților a scăzut odată cu creșterea dozelor de radiație și a fost aproape complet suprimată la 250 Gy. Consecințele iradierii gamma s-au observat și asupra creșterii în lungimiea lăstarilor, fiind proporțională cu creșterea dozei de iradiere și genotip, fapt observat și la grâu (*Triticum aestivum* L.). Conform datelor din literatură lungimea lăstarilor a scăzut cu 46% pe măsură ce doza razelor gama a crescut [71].

Frecvența maximă de formare a lăstarilor per calus embriogen s-a atestat la genotipurile Ingen 33, Ingen 35 și CAD 2/917, constituind 44,15 - 52,45%, iar la genotipurile 188 TR5021 și LT 76872 valorile fiind minime 17,09 - 27,79% în comparație cu martorul (Tabelul 3.14).

În scopul înrădăcinării regeneranților, lăstarii cu lungime de 2,5 – 4,0 cm au fost decupați de la suprafața mediului și transferați pe mediul de înrădăcinare MS cu adaos de ANA (1 mg/l). Rizogeneza s-a atestat la a 10-ea zi de la cultivare. Rata medie de înrădăcinare a lăstarilor a fost 40,66%. Somaclonele obținute la genotipurile Ingen 35, Ingen 93 și CAD 2/917 au înregistrat valori mai mari a procentului de înrădăcinare comparativ cu martorul și celelalte genotipuri. Frecvența maximă de înrădăcinare s-a evidențiat la Ingen 93, fiind de 49,22%, iar valoare minimă - la genotipul LT 76872, constituind 27,57% (Tabelul 3.14).

Tabelul 3.14. Frecvența calusogenezei, embriogenezei, regenerării *in vitro* la genotipurile de triticale supuse iradierii gama

Genotipul	Varianta	Calus embriogen (%)	Calus regenerativ (%)	Lăstari înrădăcinați (%)	Plante aclimatizate (%)
Ingen 33	Martor	61,10	34,22	40,15	45,61
	Radiație	62,12	44,15	42,32	50,15
Ingen 35	Martor	65,55	41,65	45,17	50,14
	Radiație	71,45	52,45	48,02	52,87
Ingen 93	Martor	53,33	29,24	38,93	40,15
	Radiație	51,30	30,11	49,22	43,58
Colina	Martor	61,10	38,22	32,99	30,18
	Radiație	64,45	40,91	39,00	30,57
188TR 5021	Martor	52,22	32,22	42,85	32,70
	Radiație	50,02	27,79	43,01	41,21
LT 76872	Martor	41,15	20,27	22,22	20,15
	Radiație	20,33	17,09	27,57	34,33
Rodlen	Martor	46,75	28,75	30,12	23,15
	Radiație	32,60	29,05	30,00	25,49
CAD 2/917	Martor	69,76	43,27	43,33	50,02
	Radiație	70,12	45,62	46,15	59,11

Este cunoscut faptul că rădăcinile cresc din primordiile nodale numai atunci când plantulele sunt bine dezvoltate [160]. Din numărul total de regeneranți, 47 somaclone au format un sistem radicular bine dezvoltat.

Plantulele cu rădăcini au fost transferate în vase cu substrat sol-turbă (3:1) pentru aclimatizare la condiții *ex vitro*. S-a observat că numărul de plante ce au supraveţuit după plantare pe substrat sol variază în dependență de varianta analizată (Tabelul 3.14). În faza de aclimatizare somaclonele au manifestat capacitate diferită de adaptare, care în medie a atins 42,16 %. După aclimatizare 26 plantule au fost transferate în ghivece și cultivate în condiții de laborator până la formarea spicelor.

În rezultatul analizei s-a constatat că somaclonele SC_0 derivate din cultura de embrioni maturi supuși iradierii gama au prezentat diferite trăsături morfofiziologice, frecvența și spectrul de variație al cărora au fost specifice fiecărui genotip luat în studiu [5].

Variația indusă de cultura de țesut la triticale este un fenomen bine stabilit care afectează genotipul și modifică fenotipul somaclonelor [200; 239]. Autorii au evidențiat schimbări fenotipice produse de cultura *in vitro* în comparație cu variantele martor neiradiate, ce s-au răsfrâns asupra înălțimii plantelor, numărului de noduri, lungimea spicului principal și numărul de boabe per spic.

Efectul radiației a fost confirmat prin obținerea formelor de triticale cu talia plantei diferită: forme pitice (cu talie scurtă), având înălţimea medie cuprinsă între 40 - 60 cm, din care fac parte genotipurile Rodlen și 188TR 5021 cu valori cuprinse între 85 - 105 cm (forme semipitice), categorie la care se înscriu genotipurile Ingen 33, Ingen 35 și LT 76872, precum și forme înalte, cu talia plantelor care depăşeşte 105 cm, ajungând până la 150 cm (Ingen 93, CAD 2/917). Forme pitice a mutanților au fost obținute și la orez, înălțimea plantelor fiind un caracter important în ameliorarea orezului. Plantele cu tulpini scurte cresc cantitatea de boabe formate [283]. Dragov R. și coaut. [95] au raportat pentru grâu o corelație pozitivă bine definită dintre producția de boabe și înălțimea plantelor.

Pentru evaluarea spectrului de variații, la regeneranți SC_0 după maturitate au fost colectate semințele. Pentru genotipurile iradiate numărul de boabe în spic, în medie a constituit 0 - 14 boabe, o parte din ele fiind șiștave, precum și dezvoltate incomplet. Mai mult de 26% dintre plante au format spice sterile sau boabe mărunte. Una dintre cele mai mari contribuții la randamentul culturii este caracterul numărul de boabe per spic și greutatea boabelor care este legată direct de două caracteristici morfometrice importante, cum ar fi dimensiunea și forma boabelor. Dimensiunea boabelor și forma boabelor sunt trăsături esențiale de reproducere, deoarece se consideră cele mai stabile dintre componentele ce asigură productivitatea. Cauzele

care conduc la formarea boabelor șiștave sunt condiţionate de acțiunea culturii *in vitro* cât și a razelor ionizante, ce au la bază modificări structurale și funcționale care influențează dezvoltarea bobului la stadii timpurii.

Aplicarea mutagenezei în ameliorarea culturilor include două momente esențiale: i) inducerea mutanților individuali și ii) selectarea plantelor sau liniilor cu trăsături îmbunătățite pentru programele de ameliorare [248].

Potrivit rezultatelor obținute la toate genotipurile luate în cercetare: Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, Colina, 188TR 5021, LT 76872, Rodlen și CAD 2/917 s-a remarcat o reacție specifică la acțiunea culturii *in vitro* în complex cu radiația gama, evidențiindu-se somaclonele genotipurilor Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021 și CAD 2/917.

Analizând regeneranții SC_0 după caracterul talia plantei, la genotipul CAD 2/917 s-a atestat că radiația a avut un efect stimulator asupra valorii medii, talia plantelor constituind 150 cm. Considerăm că aceste somaclone prezintă un interes mai limitat pentru amelioratori din considerente că aceste plante sunt sensibile la cădere. Este important de remarcat faptul că polignirea paiului micșorează cantitatea de producție, favorizează atacul de boli, afectează maturitatea uniformă a boabelor și împiedică recoltarea mecanizată [225].

În rezultatul evaluării caracterului numărul de boabe per spic s-a remarcat că somaclonele genotipul Ingen 35 și Ingen 93 au format 11 - 14 boabe per spic, constituind valori medii mai mari față de alte genotipuri.

Prin urmare, pentru cercetările ulterioare a somaclonelor SC_1 și SC_2 au fost selectate următoarele genotipuri de triticale: Ingen 35, Ingen 93 (soiuri de selecție locală) și soiul 188TR 5021 (soi polonez).

Concluzii la capitolul 3

1. S-a selectat și optimizat un mediu comun pentru inducerea calusogenezei din diferite tipuri de explante (embrioni maturi, frunză). S-a stabilit, că mediul de cultură MS suplimentat cu reglatori de creştere 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l) a determinat rata de proliferare sporită (90 - 95%) a celulelor calusale la genotipurile de triticale analizate, ce a permis formarea preponderență a calusului compact, globular de culoare verde (tip I).
2. Frecvența calusogenezei a variat în funcție de genotip și mediul de cultură, diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%. Puterea de influență a mediului de cultură fiind maximă și constituie 34,91%, genotipul reprezintă o sursă de variaţie de 9,3% iar interacţiunea genotip – mediu 16,46%.

3. Interacțiunea factorilor „vârsta explantului” – „genotip” denotă o influenţă semnificativă P ≤0,001 în stabilirea unui răspuns calusogenetic pozitiv la condițiile de cultivare *in vitro*. Frecvenţa calusogenezei pentru calusurile iniţiate din limb foliar, a atins cota maximă la a 2-a zi de cultivare (78,63%) și s-a atestat la segmentele bazale. Valorile cele mai mari s-au înregistrat pentru genotipurile CAD 2/917 (89,12%), LT 76872 (81,32%), Ingen 35 (80,67%), Rodlen (80,19%), cele mai mici valori s-au stabilit la Colina (69,56%). Aplicarea testului ANOVA a stabilit, că frecvența calusogenezei este determinată de vârsta explantului (70,64%), genotip (6,68%) și interacţiunea „genotip” – „vârsta explantului” (0,94%).

4. Rezultatele analizei comparative a capacității calusogenezei pentru explantele analizate au evidențiat, că utilizarea embrionilor maturi de triticale este mai eficientă decât utilizarea fragmentelor de limb foliar și a însușirilor prioritare în dependență de genotip.

5. Regenerarea de plantule pe mediul MS suplimentat cu AIA (0,5 mg/l) şi BAP (1mg/l) a înregistrat, la nivelul explantelor o rată de proliferare a zecilor de lăstari/explant. Frecvenţa regenerării lăstarilor per calus embriogen a fost de 17,27 - 43,28%. Cea mai sporită proliferare de lăstari se evidențiază la genotipurile Ingen 33 de 9 lăstari/explant, Colina – 10 şi CAD 2/917 – 13,66 lăstari formaţi. Analiza dispersională a rezultatelor obţinute, denotă o influenţă semnificativă a genotipului asupra capacității de regenerare a lăstarilor per explant, puterea de influență constituind 73,17% cu diferenţe semnificative pentru P≤0,05.

6. Înrădăcinarea *in vitro* şi elongarea lăstarilor a fost indusă pe mediu nutritiv MS suplinit cu auxina ANA în concentraţie de 1 mg/l. Rata medie de înrădăcinare a lăstarilor constituie 72,39%. Aclimatizarea regeneranților înrădăcinați *in vitro* au manifestat capacitate diferită de adaptare, valoarea medie fiind de 62,42 % la toate genotipurile.

7. S-a stabilit că activitatea mitotică a celulelor calusale *in vitro* este dependentă de genotip, indicele mitotic constituind 13,58 - 55,04% în toate fazele diviziunii mitotice la genotipurile: Ingen 35, Ingen 93, Colina, 188TR 5021, Rodlen și CAD 2/917. S-a constatat, că cultura *in vitro* în celulele calusale induce mutații în anafază – telofază de tipul: celule binucleate, aranjare ciclică a cromozomilor, fragmente cromozomiale punctiforme ce derivă din instabilităţile mitozei şi care pot fi transmise regeneranților.

8. S-au stabilit dozele stimulatoare și inhibitoare a razelor gama asupra embrionilor maturi de triticale pentru inducerea calusogenezei, morfogenezei și regenerării de plantule, cuprinse în diapazonul 50-250Gy. S-a constatat că radiațiile gama în limitele dozelor 50-15 Gy a avut un efect stimulator asupra frecvenței calusogenezei, morfogenezei și regenerării în comparație cu martorul, semnificative la nivel de 95 - 99,9%. Expunerea la dozele de 200-250Gy

au avut efect inhibitor asupra creșterii calusului, formării zonelor morfogene, calusul necotizându-se pe parcursul subcultivării, diferențele fiind semnificative la nivel de 99 - 99,9%.

9. Doza de radiație 150 Gy a prezentat cel mai eficace efect în stimularea acumulării biomasei calusale (confirmată cantitativ) în comparație cu martorul, morfogenezei și regenerării de lăstari. Genotipul, doza de radiație, cât și interacțiunea genotip – radiație au avut un rol semnificativ ($P \leq 0,05$; 0,001), puterea de influență majoră fiind atribuită genotipului (49,35%).

10. Somaclonele SC_0 derivate din cultura de embrioni maturi supuși iradierii gama au prezentat diferite trăsături morfofiziologice (talia plantei, lungimea spicului principal și numărul de boabe per spic), frecvența și spectrul de variație al cărora au fost specifice fiecărui genotip luat în studiu.

4. ASPECTE GENETICE A GENOTIPURILOR DE TRITICALE OBȚINUTE PRIN MUTAGENEZA FIZICĂ ȘI CULTURA *IN VITRO*

Îmbunătățirea multor trăsături agronomice, inclusiv a calității cerealelor, necesită ca variabilitatea lor genetică să fie separată de influențele non-genetice. Timp de mulți ani, obiectivul principal al programelor de ameliorare a fost înlocuirea soiurilor tradiționale cu soiuri moderne cu randament ridicat și rezistență la boli, ceea ce a condus la o reducere a diversității genetice, în principal caracteristicile de calitate și însușirilor nutriționale [180].

Mutageneza este utilizată pe scară largă pentru a crește randamentul, dar mai puțin pentru a crește valoarea nutrițională [248]. În special, soiurile mutante nu sunt recunoscute ca organisme modificate genetic și sunt distribuite pe scară largă în toate țările fără scepticism public sau restricții suplimentare de reglementare. Progresele în biologia moleculară au avansat foarte mult selecția mutațiilor, făcând-o mai eficientă decât se credea anterior [77].

Diversitatea genetică poate fi estimată, folosind trăsăturile morfologice. Dezvoltarea continuă și disponibilitatea unor noi resurse genetice sunt esențiale pentru îmbunătățirea soiurilor, iar pentru diferențierea genotipurilor poate fi utilizată caracterizarea fenotipică [351].

4.1. Evaluarea caracterelor biomorfologice la somaclonele de triticale obținute din embrioni iradiați cu raze gama

Somaclonele, obținute prin cultura *in vitro*, posedă un spectru larg de variație a caracterelor morfologice și biochimice, ceea ce confirmă eficiența folosirii culturii de calus în inducerea variabilității, prin obținerea somaclonelor ce prezintă interes agronomic [245; 277; 282; 350].

Cercetările, privind inducerea variabilității genetice *in vitro*, prin aplicarea radiațiilor gama, au atestat schimbări în procesul de calusogeneză, morfogeneză și asupra frecvenței aparițiilor mutațiilor la diferite plante, inclusiv triticale [7]. Din surse bibliografice, sunt cunoscute avantajele variației somaclonale și mutagenezei. În majoritatea cazurilor, variația somaclonală la diferite specii de plante a fost determinată pe baza caracterelor morfologice și fiziologice [228]. Eficiența radiației gama în calitate de inductor al variațiilor genetice la orz a fost confirmată prin crearea soiurilor mutante cu proprietăți net superioare ce țin de productivitate, calitate, arhitectura plantei și rezistența la diferite boli [15].

Prin urmare, prezintă interes evaluarea acțiunii culturii *in vitro* separate și în comun cu radiația gama în calitate de modificatori genetici asupra caracterelor agro-morfologice la somaclonele de triticale. În timpul perioadei de vegetație, plantele trec prin mai multe etape

(faze) bine definite, care se manifestă prin modificări ale aspectului exterior datorită formării și creșterii diferitor organe: frunze, tulpini, inflorescențe [17].

În rezultatul observărilor efectuate asupra fazelor de vegetaţie a plantelor de triticale conform scării Zadocks s-a evidenţiat, că toate plantele de triticale se aflau la aceeaşi fază de vegetaţie, dar la diferite stadii de vegetaţie. Acest decalaj între stadiile de vegetaţie s-a păstrat şi la faza de vegetaţie: *Formarea boabelor și maturitatea în lapte* și *Maturitatea în ceară*.

În rezultatul evaluării s-au remarcat variaţii ale stadiilor de vegetaţie în cadrul acestei faze cu 1 - 2 stadii mai avansate, astfel SC_1 obținute *in vitro* și varianta martor 188TR 5021 se aflau la stadiile 73 - 75 conform scării Zadocks, ce corespunde cu *începutul maturităţii* şi *maturitate în lapte*, iar SC_1 188TR 5021 iradiate la stadiul 83 (*începutul maturităţii în ceară*). Somaclonele Ingen 93, obținute *in vitro* se aflau la stadiul 71 - 73 (*bob apos, începutul maturității în lapte*), pe când SC_1 iradiate și martorul erau la stadiul 77, *sfârşitul maturității în lapte* (Figura 4.1).

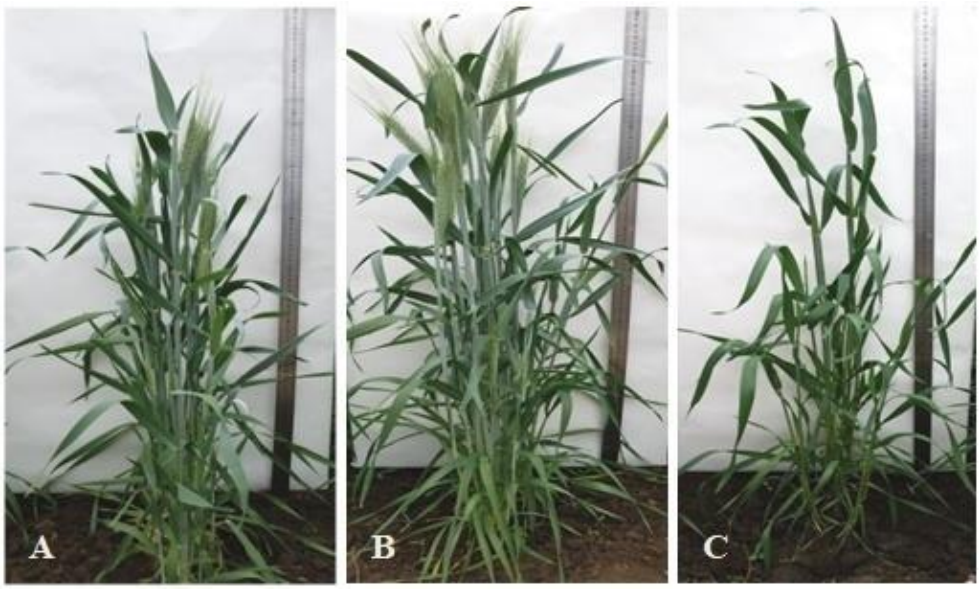


Fig. 4.1. Variantele experimentale a genotipului Ingen 93 la diferite faze de vegetație: A – martor; B – iradiere; C – cultura *in vitro*.

De rând cu aceasta s-a atestat variaţia morfologică – culoarea spicului, spic steril s-au observat plante pitice şi semipitice la somaclonele iradiate 188TR 5021, comparativ cu forma martor din aceeaşi combinaţie. Pentru somaclonele Ingen 93, obținute prin cultura *in vitro,* s-a atestat că frunza steag este mai lată și mai mare, de culoare verde, iar la martor culoarea frunzei fiind verde-albăstruie, ceroasă și de dimensiuni mai mici. Plantele au fost colectate în faza de vegetaţie: *Maturitatea deplină*, stadiul de vegetaţie: *Semințe ieșite din repausul germinativ secundar* (99).

Pentru aprecierea varialibității somaclonale au fost evaluați parametrii morfologici precum: talia plantei, lungimea spicului principal și ultimului internod, numărul fraților fertili și

internodurilor per plantă, numărul boabelor per spic, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe [80]. În rezultatul evaluărilor biomorfologice s-a atestat variație semnificativă a valorii medii a caracterelor agro-morfologice la somaclonele de triticale, la nivel de 95 - 99,9% și au depins de genotip, factorii luați în studiu și indicele analizat (Anexa 4).

Talia plantei este un parametru important pentru dezvoltarea plantei. Cele mai multe soiuri de triticale sunt cu tulpină lungă și predispuse la polignire. Datele literaturii sugerează că înălțimea de peste 91cm a plantulelor condiționează o predispoziție la cădere [358]. Polignirea micșorează cantitatea de producție, favorizează atacul de boli, afectează maturitatea uniformă a boabelor și împiedică recoltarea mecanizată [225].

Valorile medii ale caracterului *talia plantei* variază pentru somaclonele SC_1 obținute prin cultura *in vitro* și este dependentă de genotip (Figura 4.2).

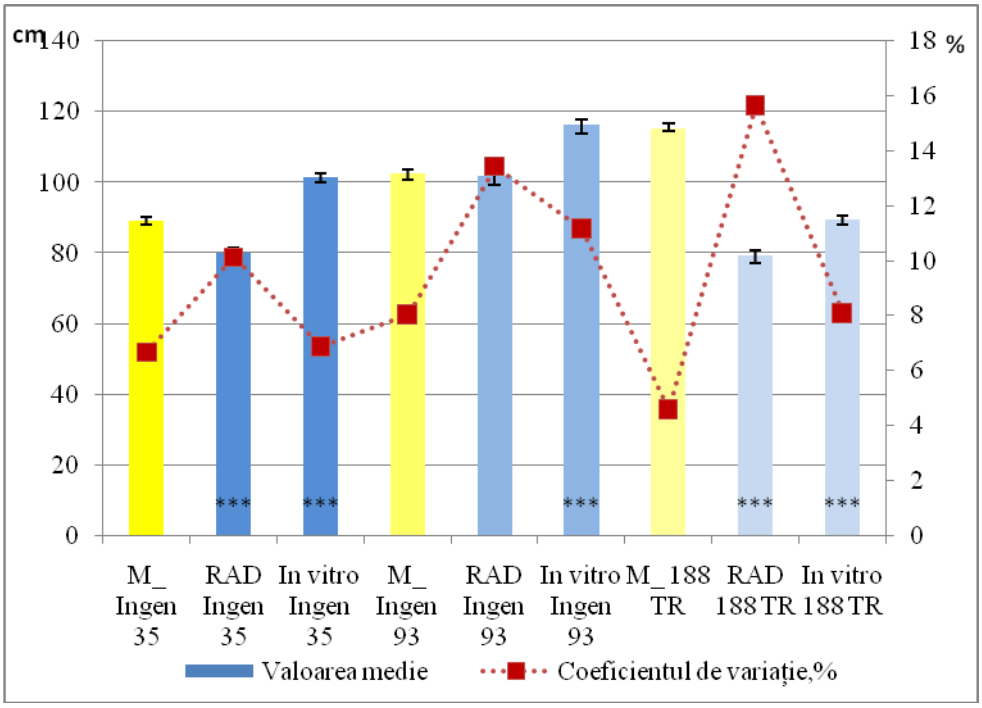


Fig. 4.2. Variația caracterului *talia plantei* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: *** – semnificativ pentru P≤0,001

Astfel, la genotipurile Ingen 93 (*in vitro*) și Ingen 35 (*in vitro*) s-au constatat valori medii mai mari față de martor (cu 13,49 - 13,89%) (Figura 4.3). Valoare maximă a caracterului talia plantei (116,33 cm) a prezentat genotipul Ingen 93 (*in vitro*), diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%.



Fig. 4.3. Caracterul *talia plantei* la somaclonele SC_1 a genotipului Ingen 35: A – martorul; B – varianta iradiată; C – varianta *in vitro*.

La variantele iradiate cu raze gama s-au înregistrat valori medii mai mici față de martor pentru toate genotipurile cu 9,98 - 31,36 %. Deci, radiația gama a avut efect inhibitor asupra caracterului *talia plantei* pentru toate somaclonele studiate. Cele mai mici valori s-au înregistrat la genotipul 188TR 5021 (RAD), constituind 79,38 cm. Aceste somaclone s-au evidențiat prin talia plantei, obținându-se somaclone pitice și semipitice (Figura 4.4). Coeficientul de variație a caracterului *talia plantei* a atins valori mici și medii (4,57 - 15,68%), indicând stabilitate.

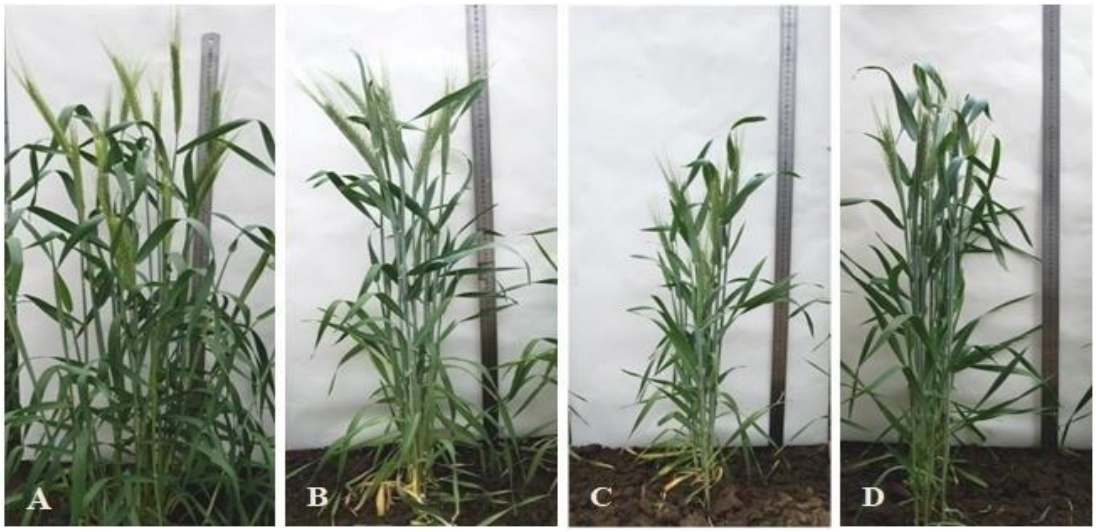


Fig. 4.4. Caracterul *talia plantei* la somaclonele SC_1 a genotipului 188TR 5021: A – martorul; B, C – variantele iradiate; B – semipitice; C – pitice; D – variantele obținute *in vitro*.

De asemenea, s-a înregistrat micșorarea valorilor medii a caracterului *numărul de frați fertili per plantă* cu 18,06 - 79,17% față de martor, pentru genotipurile Ingen 93 (*in vitro*) și 188 TR 5021 (*in vitro*). Cea mai mică valoare a mediei caracterului *frați fertili per plantă* (0,5), s-a

estimat pentru genotipul 188TR 5021 (*in vitro*), fiind semnificativă la nivel de 99,9%, probabil se datorează specificului impactului condițiilor *in vitro*. Pentru celelalte genotipuri s-a constatat o micșorare ușoară a valorilor medii, nesemnificativă în comparație cu martorul, pentru toți factorii luați în studiu (Figura 4.5). Pentru caracterul *numărul de frați fertili per plantă*, coeficientul de variație este mare (39,97 - 114,47%), ceea ce atestă o variație puternică.

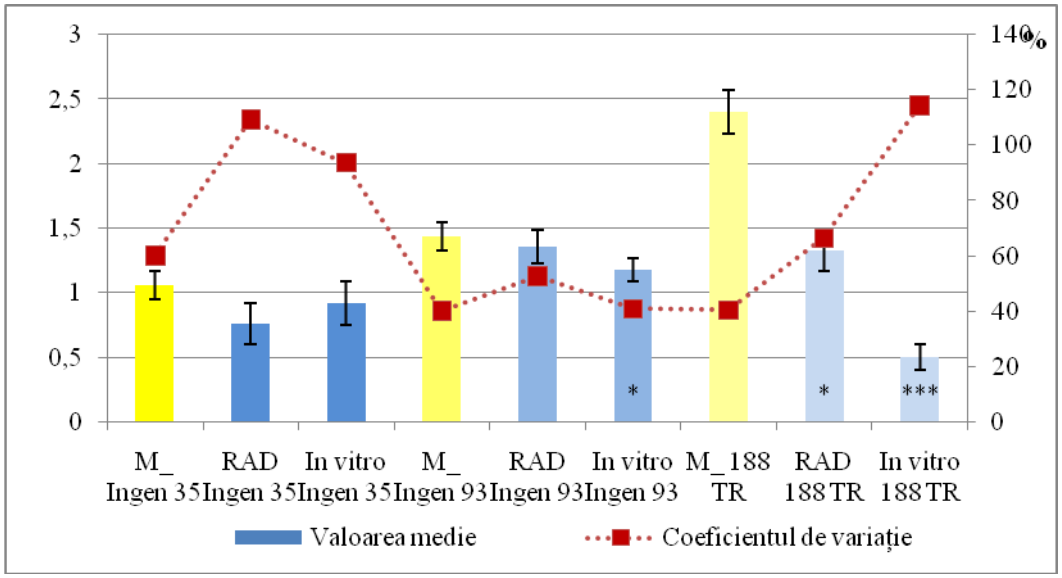


Fig. 4.5. Variația caracterului *numărul de frați fertili per plantă* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: *, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,001.

În rezultatul analizei datelor obținute pentru caracterul *lungimea spicului principal* s-a evidențiat reacție specifică pentru fiecare genotip. S-au constatat valori medii mai înalte cu 9,37-13,29% pentru genotipurile Ingen 93 (*in vitro*, RAD) și Ingen 35 (*in vitro*), diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9% în comparație cu martorul, iar pentru genotipul 188TR 5021 (RAD) media s-a redus cu 8,39% în comparație cu martorul, semnificativă la nivel de 95% (Figura 4.6).

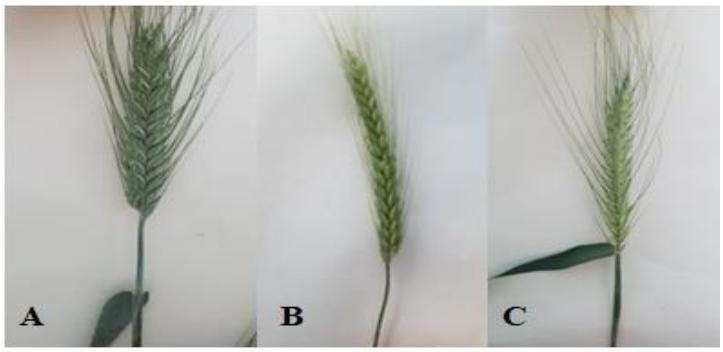


Fig. 4.6. Caracterul lungimea spicului principal la somaclonele SC_1 genotipul 188TR 5021: A – martorul; B – varianta *in vitro*; C – varianta iradiată, sterilă.

Cea mai înaltă valoare a caracterului lungimea spicului (12,7 cm) s-a înregistrat pentru somaclonele Ingen 35 (*in vitro*). Coeficientul de variație a acestui indice a constituit 8,11 - 14,54%, ceea ce corespunde cu un nivel mic și mediu de variabilitate (Figura 4.7).

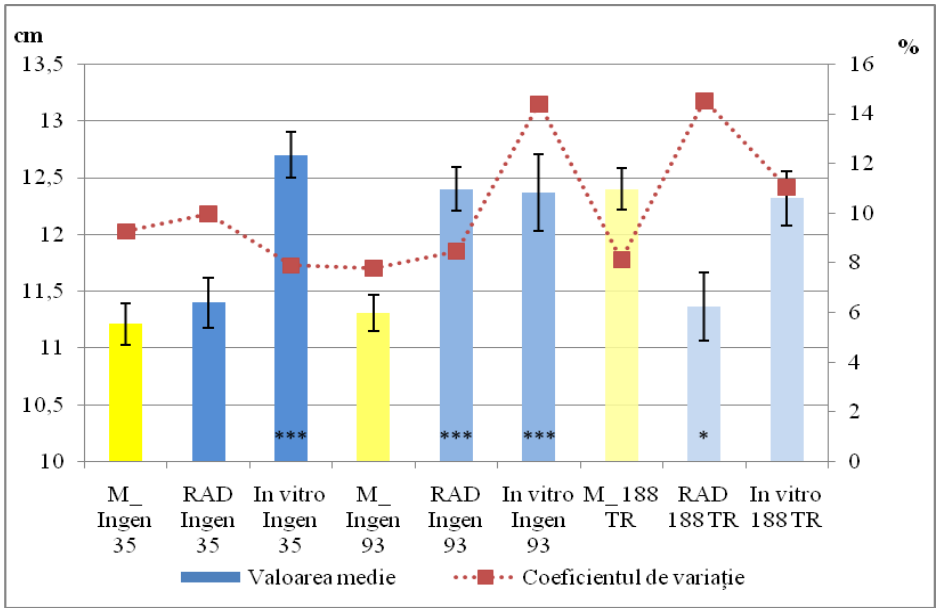


Fig. 4.7. Variația caracterului *lungimea spicului principal* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: *, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,001.

În mod similar, la variantele supuse iradierii cu raze gama și obținute *in vitro*, s-au atestat valori mai mari a caracterului *lungimea ultimului internod* cu 4,33 - 17,80%, față de martor pentru genotipurile Ingen 93 (RAD, *in vitro*) și Ingen 35 (*in vitro*). Cele mai mici valori medii a înregistrat genotipul 188TR 5021, constituind 21,17 cm, (RAD) respectiv 27,54 cm, (*in vitro*), fiind semnificative la nivel de 99,9% (Figura 4.8).

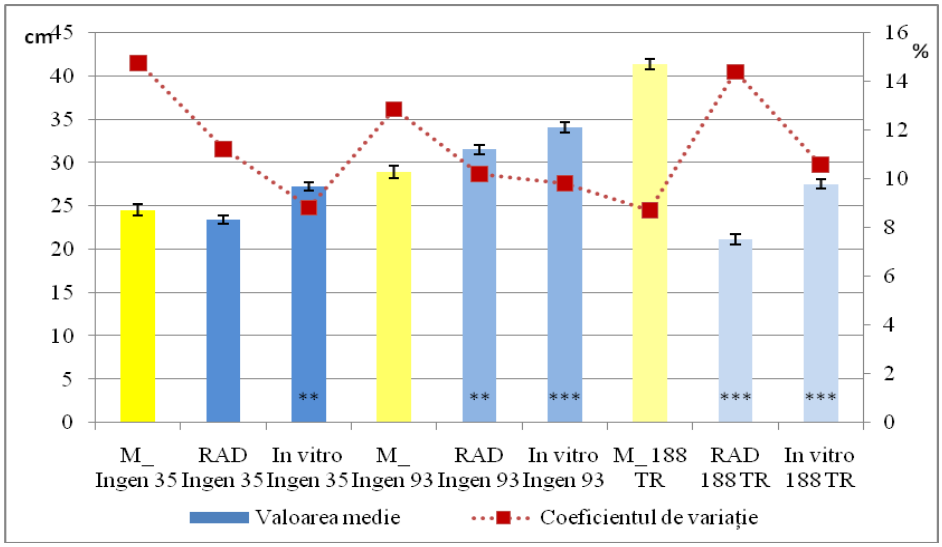


Fig. 4.8. Variația caracterului *lungimea ultimului internod* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: **, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,01; 0,001.

Principalele caractere ce determină productivitatea plantei și capacitatea de concurență a unui genotip față de celelalte genotipuri sunt: numărul de boabe, greutatea boabelor per spic și masa a 1000 boabe. Ereditarea acestor caractere, după datele studiului bibliografic, spre deosebire de caracterele calitative sunt controlate poligenic, fiecare genă fiind în dependență de acțiunea și interacțiunea ei cu alte gene ce au efect aditiv la manifestarea caracterului [180].

Caracterul *numărul de boabe per spic principal* a indicat valori medii mai mari cu 23,97%, față de martor la genotipul Ingen 93 (*in vitro*), semnificativ (95%). Aceste somaclone au înregistrat și cele mai mari valori (47,11) a caracterului respectiv. Efectul radiației gama s-a remarcat și asupra indicelui *numărul de boabe per spic principal*. S-au atestat diferențe semnificative (pentru P≤0,01; 0,001), cu 44,88 - 79,04% mai mici în comparație cu martorul pentru genotipul Ingen 35 (RAD) și 188TR 5021 (RAD, *in vitro*). Valoare cea mai mică (9,86) s-a înregistrat la genotipul 188TR 5021 (RAD). Evaluarea variabilității caracterului *numărul de boabe per spic principal* a atestat o variație mare (24,00 - 86,71%) (Figura 4.9).

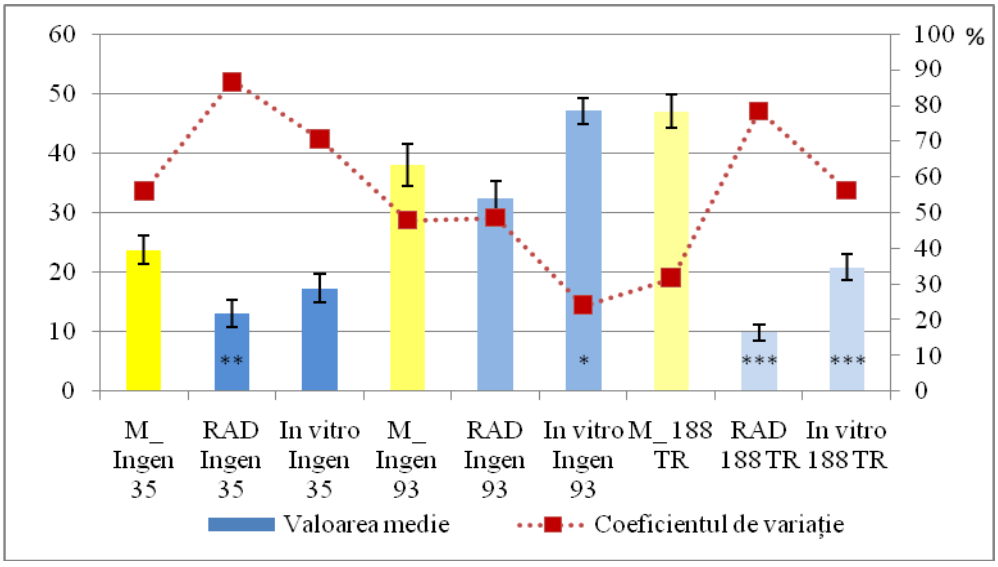


Fig. 4.9. Variația caracterului *numărul de boabe* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: *, **, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Conform datelor din literatură greutatea boabelor corelează direct cu productivitatea. Mărimea și forma boabelor sunt caractere esențiale de reproducere, fiind cele mai stabile [180].

Valoarea medie pentru caracterul *greutatea boabelor* a înregistrat diferențe semnificative dintre variante la nivel de 95 - 99% la toate genotipurile în comparație cu martorul. Valori medii mai mici cu 21,38 - 79,17% față de martor, s-au stabilit la genotipurile Ingen 35 (RAD), Ingen 93 (RAD) și 188TR 5021 (RAD, *in vitro*). Cea mai mare valoare a acestui caracter față de martor a fost remarcată pentru genotipul Ingen 93 (*in vitro*) și a constituit 27,58%. Coeficientul de

variație a atins valori mari (31,47 - 92,07%), ceea ce denotă o variabilitate mare a acestui caracter (Figura 4.10).

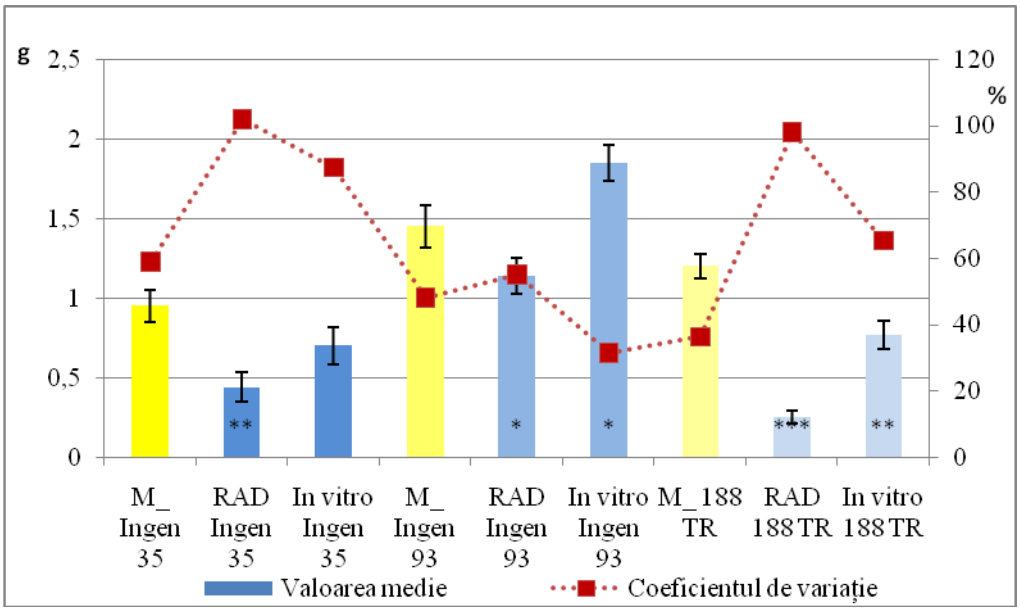


Fig. 4.10. Variația caracterului *greutatea boabelor* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: *, **, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Analizând datele pentru caracterul *masa a 1000 boabe* la variantele iradiate cu raze gama, s-au înregistrat valori medii mai mici cu 21,15 - 32,34%, față de martor, pentru genotipul Ingen 93, semnificativ la nivel de 99% (Figura 4.11). Cultura *in vitro* a cauzat modificarea valorii medii doar la genotipul 188TR 5021, fiind atestată,creșterea de 1,25 ori față de martor, semnificativă (95%). Coeficientul de variație a acestui indice a constituit 14,59 - 54,42%, ceea ce corespunde cu un nivel înalt de variabilitate.

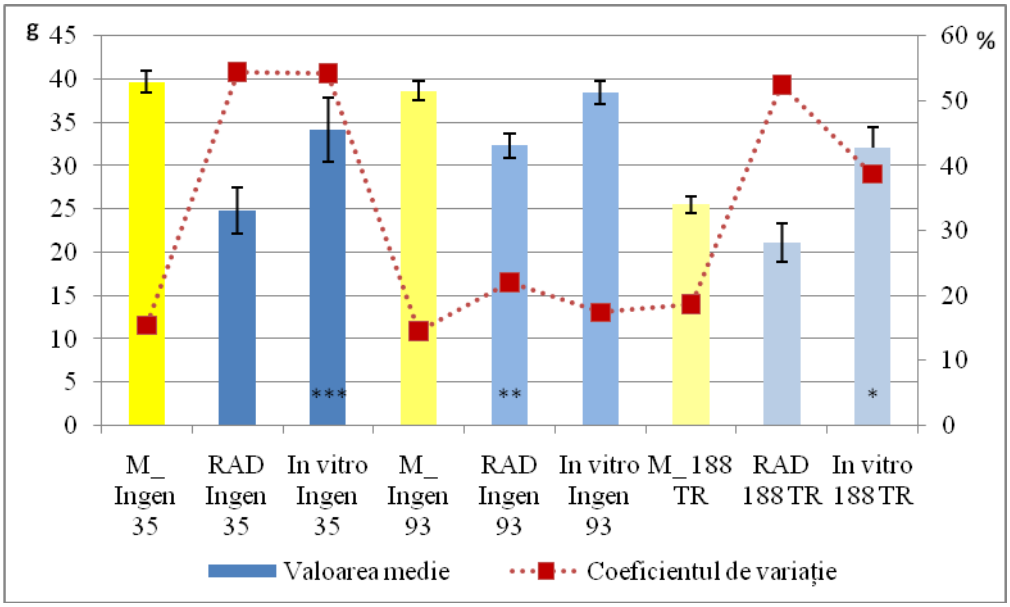


Fig. 4.11. Variația caracterului *masa a 1000 de boabe* la somaclonele de triticale (SC_1).
Notă: **, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,01; 0,001.

Analiza dispersională a rezultatelor obținute prin aplicarea testului ANOVA, denotă că asupra variației caracterelor cantitative la somaclonele de triticale SC_1 o contribuție semnificativă (la nivel de 95 - 99,9%) o are genotipul, radiația, cultura *in vitro* precum și interacțiunea dintre genotip și factorii analizați (Anexa 5).

Acțiunea maximală a manifestat-o interacțiunea genotipului cu factorii analizați fiind semnificative la nivel de 99 - 99,9%. S-a evidențiat interacțiunea genotipului cu cultura *in vitro*, puterea de influență a atins valori de la 5,87 - 45,32%, în dependență de caracter. Valorile cele mai înalte au fost înregistrate pentru caracterele: *numărul de fraţi fertili* (21,32%), *lungimea ultimului internod* (40,45%) și *talia plantei* (45,32%). Interacțiunea genotipului cu radiația în dependență de caracter a atins valori de la 3,64 - 41,62%. Cele mai mari valori sunt remarcate la caracterul *lungimea ultimului internod,* constituind 41,62%. Pentru caracterul *masa a 1000 boabe* interacțiunea genotipului cu factorii analizați a avut valori atenuate (4,20 - 4,79%), dar semnificative la nivel de 99 - 99,9%.

Influența genotipului este semnificativă la nivel de 95 - 99,9% pentru toate caracterele bio-morfologice studiate și a atins valori de la 3,27 - 30,77%. Cele mai înalte valori a acestui indice au fost remarcate pentru caracterele: *greutatea boabelor* - 22,70% (cultura *in vitro*), *talia plantei* - 26,84% (RAD) și 28,74% pentru cultura *in vitro*. Puterea de influență maximală a manifestat-o genotipul pentru caracterul *lungimea ultimului internod* a somaclonelor obținute prin cultura *in vitro,* constituind 30,77%.

Puterea de influență a radiației asupra caracterelor analizate este maximală pentru indicii: *numărul de boabe* (21,87%) și *greutatea boabelor* (20,52 %), fiind semnificative la nivel de 99,9%. Cultura *in vitro* a avut impact semnificativ la nivel de 99,9% și a atins valori de la 2,44 - 18,84%. Pentru caracterul *numărul de fraţi fertili* puterea de influență a constituit 18,84%.

În rezultatul cercetărilor s-au evidențiat somaclonele (SC_1) a genotipului Ingen 35 (RAD), după valorile medii în comparație cu martorul, fiind determinate de 3 caractere biomorfologice: *talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod*. Pentru somaclonele (SC_1) a genotipului Ingen 93 obținute *in vitro*, toate caracterele au avut valori mai mari decât martorul și varianta iradiată, semnificative (95 – 99,9%), iar pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), s-a stabilit o reducere semnificativă la nivel de 95 - 99,9% pentru toate caracterele cercetate în comparație cu martorul.

4.2. Analiza polimorfismului genetic al somaclonelor SC_1 la triticale

Crearea de noi soiuri la culturile agricole se bazează pe utilizarea variabilității genetice naturale sau create de om. Pentru a identifica și caracteriza diverse genotipuri prețioase pentru ameliorare sunt utilizate metode ce au ca scop obținerea de marcheri genetici. Ei pot fi morfologici, biochimici sau moleculari.

Marcherii morfologici determină forma, culoarea sau unii componenți biochimici specifici, numărul lor fiind relativ mic. Odată cu dezvoltarea geneticii moleculare a apărut o clasă nouă de marcheri moleculari – fragmente de ADN, care corespund succesiunilor nucleotidice ce fac parte din structura genei valoroase sau corelează cu ea. Identificarea unei noi clase de marcheri genetici, respectiv a marcherilor moleculari, reprezintă un adevărat eveniment revoluţionar în metodologia de ameliorare a plantelor. Strategia utilizării marcherilor moleculari se bazează pe evidenţierea polimorfismului molecular, care la genomurile plantelor este datorat, în mare parte, variaţiei cantităţii de ADN repetitiv. Cele mai importante aplicaţii ale marcherilor moleculari în ameliorarea plantelor sunt reprezentate de selecţia asistată de marcheri, accelerarea backcrossului, detectarea diversităţii şi diferenţelor genetice dintre diferite populaţii [299].

Astfel, aplicarea marcherilor la nivel de ADN radical a modificat metodele de apreciere a variabilității genetice a plantelor, pașaportizarea și clasificarea soiurilor, cartarea și determinarea unor loci, responsabili de calitățile valoroase în ameliorare [79; 207; 255]. Marcherii la nivel de ADN pot fi utilizați în mod direct pentru analiza moleculară a genomului. Polimorfismul secvențelor de ADN poate fi detectat datorită diferențelor de situsuri de hibridare cu un primer arbitrar prin tehnicile MAAP (*Multiple Arbitrary Amlicon Profiling ADN*): RAPD (*Random Amplified Polymorphic ADN*), AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), DAF (*ADN Amplification Fingerprinting*). Aceste metode constau în realizarea unei reacții PCR pe ADN-ul studiat, utilizând un primer de secvență arbitrară. Tehnicile ce folosesc amorse arbitrare, în special RAPD, au obținut o răspândire largă, deoarece sunt rapide, necesită puțin ADN și fiind bazate pe PCR sunt mai simplu automatizate [319].

Tehnica RAPD cu succes este folosită în construcția hărților genetice, care permit identificarea și marcarea unor caractere calitative și cantitative prețioase și în identificarea marcherilor asociați cu rezistența plantelor la diverse boli și dăunători [13; 241]. Dar cel mai mult această tehnică este folosită cu scopul de a detecta un polimorfism de secvență a ADN-ului genomic [14; 326].

Așadar, marcherii moleculari reprezintă un instrument efectiv în studiul genetic al plantelor, simplificând mult cercetarea naturii genelor clasice, locilor caracterelor cantitative, cartarea genelor, transferul de genelor în alte forme de plante cu crearea de noi soiuri de culturi

cerealiere, leguminoase, fructifere. Dar utilizarea practică a marcherilor moleculari pentru crearea soiurilor noi înalt productive de culturi cerealiere încă nu e aplicată pe larg.

Cercetările efectuate în ultimii ani sunt importante prin obţinerea şi studierea soiurilor noi de triticale, care sunt cu mult mai productive şi rezistente, decât formele parentale. Din an în an aceste soiuri sunt răspândite mai larg în agricultura ţării noastre şi sunt folosite cu succes atât în alimentaţia umană, cât şi a animalelor. Aceasta dictează necesitatea efectuării studiilor genetice de pașaportizare a genotipurilor, identificarea marcherilor moleculari asociați cu caractere valoroase. O sarcină actuală rămâne a fi sporirea genofondului de culturi cerealiere în vederea diversificării formele și obținerii de noi genotipuri.

În cadrul acestui studiu a fost efectuată analiza variabilității genetice la somaclonele a 3 genotipuri de triticale (Ingen 35, Ingen 93 și 188TR 5021) prin utilizarea 12 primeri decameri RAPD. În baza acestor genotipuri au fost create variantele experimentale: *in vitro* (IV) și iradiat, precum și martorul (M), care reprezintă formele inițiale.

Rezultatele au pus în evidenţă diversitatea amprentelor molecular-genetice în funcţie de genotip și primerul utilizat [81]. Analiza produselor de amplificare cu primerul OPA11 a evidențiat 5 fragmente nucleotidice cu dimensiunea cuprinsă între 477 - 855 pb (perechi de baze) (Figura 4.12, A). Genotipurile investigate, cât și formele acestora au prezentat aceleași spectre moleculare (din 5 benzi) cu excepția Ingen 35 M care s-a caracterizat printr-un spectru diferit (4 benzi). Astfel, primerul a generat 4 fragmente comune pentru toate genotipurile și unul polimorf (546 pb) care lipsește la Ingen 35 M.

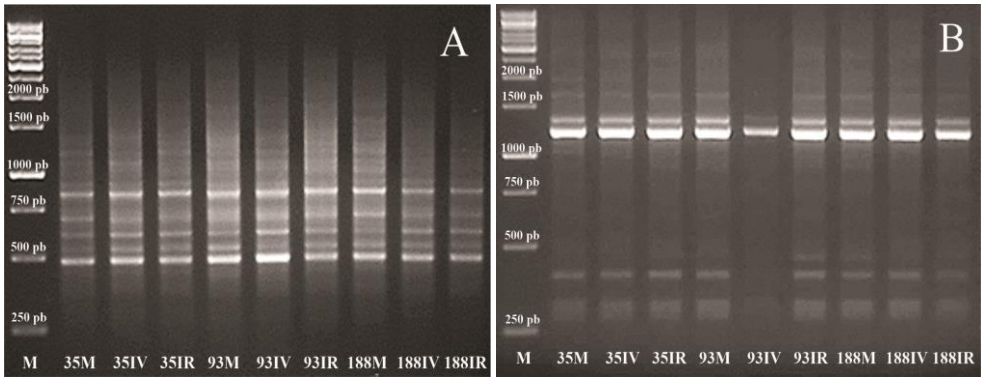


Fig. 4.12. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPA11 (A) și OPB14 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

La genotipurile de triticale au fost evidențiate 6 fragmente de ADN prin genotiparea RAPD cu OPB14 (Figura 4.12, B). Lungimea secvențelor a variat de la 320 pb la 1671 pb. În amprenta electroforetică la forma Ingen 93 *in vitro* au lipsit ampliconii de 320, 407, 464 și 1671

pb. Prin urmare, OPB14 a identificat 2 fragmente comune, care se și întâlnesc cu cea mai mare frecvenţă fiind prezente la toate probele studiate, și 4 – polimorfe.

Rezultate similare s-au observat și în cazul oligomerului OPC05 (Figura 4.13, B), care a determinat amplificarea unui singur profil molecular pentru majoritatea genotipurile, excepție fiind Ingen 93 IV care a prezentat un alt profil. În total, pentru acest primer, au fost identificate 9 secvențe nucleotidice cu un interval de amplificare între 372 - 1251 pb. Printre benzile obținute, în funcție de frecvența răspândirii, s-au depistat 3 benzi comune și 4 polimorfe. Cel mai mic număr de ampliconi a fost observat la Ingen 93 IV (5) comparativ cu celelalte genotipuri și forme, toate înregistrând același profil molecular din 7 ampliconi. Astfel, la Ingen 93 IV au lipsit fragmentele: 372, 543, 617 și 737 pb. Același genotip, Ingen 93 IV, s-a remarcat și prin prezența a 2 ampliconi specifici: 692 și 863 pb.

OPB12 se numără printre primerii utilizați în studiul de față cu cele mai multe benzi și profile moleculare amplificate (Figura 4.13, A). Analizând cele 5 profile moleculare identificate se poate observa similaritatea dintre formele iradiate Ingen 35 IR și Ingen 93 IR, 188TR 5021 IV și 188TR 5021 IR. De asemenea, în baza genotipării cu OPB12, s-a atestat o diferențiere pronunțată între amprentele moleculare ale formelor martor și formele *in vitro*/iradiat. Au fost obținuți în total 16 ampliconi cu masa moleculară cuprinsă între 320 - 1764 pb, dintre care 7 comuni și 9 polimorfi. Ampliconi specifici pentru o singură probă de triticale nu au fost identificați însă s-a depistat un fragment de 1150 pb care a fost amplificat în cazul genotipului 188TR 5021 (formele martor și iradiat) diferențiind-ul de celelalte genotipuri. OPB12 a prezentat cele mai multe benzi în spectrele electroforetice la 188TR 5021 M și 188TR 5021 IR (15) și cele mai puține la Ingen 35 IR (11). Astfel, la 188TR 5021 M și 188TR 5021 IR a lipsit din profilul molecular RAPD fragmentul de dimensiunea 606 pb.

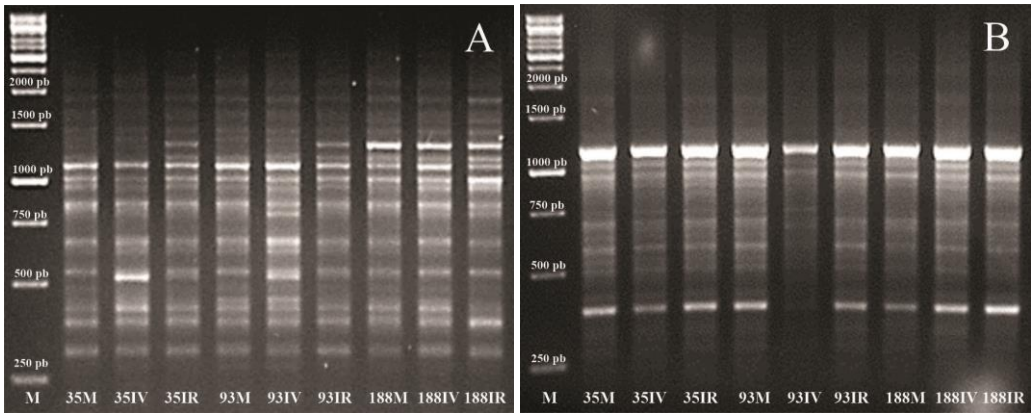


Fig. 4.13. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPB12 (A) și OPC05 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

Analiza fragmentelor RAPD amplificate cu oligomerul OPC07 (Figura 4.14, A) a scos în evidență rezultate asemănătoare cu cele descrise la OPB12. OPC07 a generat 16 ampliconi cu dimensiuni încadrate într-un interval larg de amplificare precum 295 - 2891 pb. Studiul amprentelor moleculare obținute cu OPC07 a stabilit 4 profile moleculare diferite. În baza acestor profile s-a constatat o discriminare între formelor martor și cele *in vitro*/iradiat, cu excepția genotipului 188TR 5021 pentru care s-au dovedit a fi identice. Genotipul 188 TR 5021 s-a remarcat și prin cele mai puține fragmente amplificate (11) pentru toate formele. Printre fragmentele ADN identificate cu OPC07 au fost depistate 7 fragmente comune, 7 polimorfe și 2 specifice. Forma *in vitro* a genotipului Ingen 93 s-a caracterizat prin prezența unui spectru molecular diferit față de toate celelalte forme studiate (Figura 4.14, A) și prin prezența a 2 benzi specifice (1353 și 1500 pb). Astfel, acest primer a contribuit major în diferențierea genetică a formei Ingen 93 IV.

Primerul OPD07 a amplificat 8 fragmente ADN (Figura 4.14, B) cu diferite concentrații (intensitate în spectru electroforetic), majoritatea dintre ele fiind depistate la toate probele PCR, determinând un polimorfism scăzut la triticalele investigate. Dimensiunea ampliconilor a variat între 272 - 1730 pb. Deci, au fost identificate 6 fragmente comune, unul polimorf și unul specific pentru Ingen 93 IV (1443 pb). OPD07 a determinat prezența a 2 profile moleculare, unul fiind comun pentru toate genotipurile iar unul caracteristic pentru Ingen 93 IV cu același număr de ampliconi (7) dar diferit după masa moleculară. Astfel, în amprenta electroforetică a Ingen 93IV a lipsit fragmentul 430 pb însă a fost depistat un fragment unic.

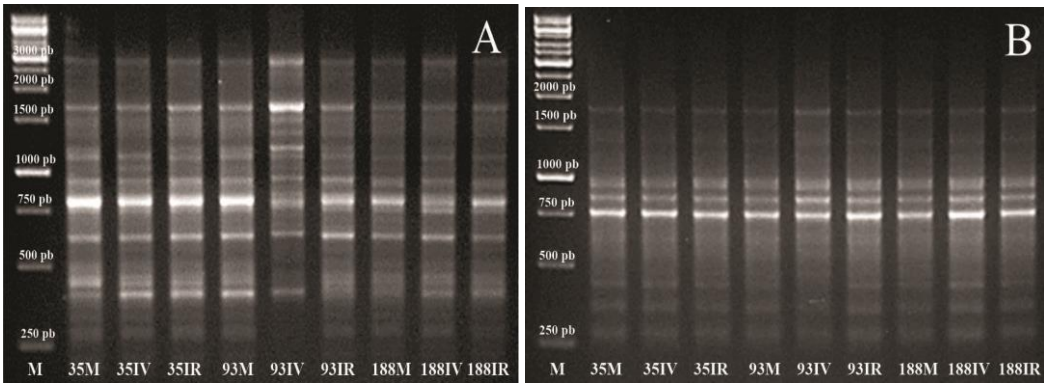


Fig. 4.14. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPC07 (A) și OPD07 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

Analiza produselor de amplificare cu primerul OPE17 a scos în evidență 6 secvențe nucleotidice cu masa moleculară cuprinsă între 656 și 4000 pb (Figura 4.15, A). Genotipurile investigate au prezentat același profil molecular (din 6 fragmente) cu excepția 188TR 5021 IR

care s-a caracterizat printr-un profil diferit (5 fragmente). Astfel, primerul a identificat 5 fragmente comune pentru toate genotipurile și unul polimorf (4000 pb) care lipsește la 188TR 5021 IR.

OPF08 a determinat amplificarea unui număr mai mare de fragmente, comparativ cu alți decameri (Figura 4.15, B). Au fost depistate 11 fragmente ADN cu o lungime care variază între 409 - 1962 pb. Frecvența acestora în cadrul genomurilor analizate este mare, 9 fragmente fiind comune iar 2 polimorfe. Studiul fiecărui spectru electroforetic separat a evidențiat profile moleculare similare cu mici excepții.

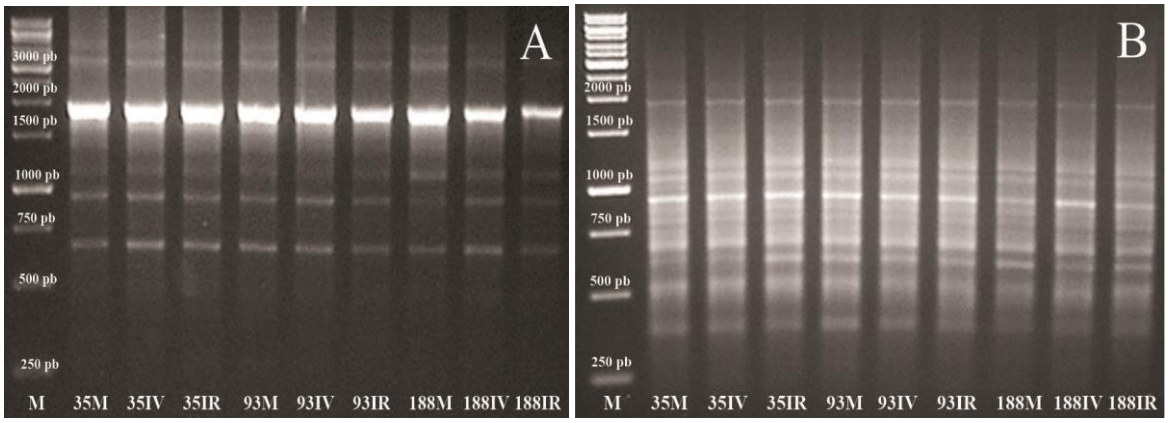


Fig. 4.15. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPE17 (A) și OPF08 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

Număr maxim de ampliconi (11) a fost observat la formele de triticale Ingen 35 IV și Ingen 35 IR prezentând un profil identic. Un alt profil se întâlnește la formele genotipului Ingen 93 și 188TR 5021 M, 188TR 5021 IV, în componența căruia sunt 10 ampliconi, lipsind cel de 754 pb. La genotipul Ingen 35 M lipsește fragmentul de 907 pb. Număr minim de ampliconi (9) a fost constatat la 188TR 5021 IR, la care nu au fost amplificate secvențele de 754 și 907 pb.

Același număr de benzi electroforetice ca și în cazul OPF08 au fost stabilite și cu primerul OPG06 (Figura 4.16, A). Printre cele 11 fragmente identificate, 9 s-au demonstrat a fi comune, un fragment polimorf (778 pb) și unul specific pentru 188TR 5021 M (961 pb). Masa moleculară a fragmentelor nucleotidice a variat de la 429 până la 1513 pb. Ampliconul de 778 pb nu s-a depistat în spectrele formelor iradiate la toate genotipurile investigate și, de asemenea, la 188TR 5021 M. Astfel, formele iradiate ale genotipurilor de triticale, în baza genotipării cu OPG06, s-au caracterizat prin cele mai puține fragmente ADN (9) în profilul lor electroforetic comparativ cu formele martor și *in vitro* (10).

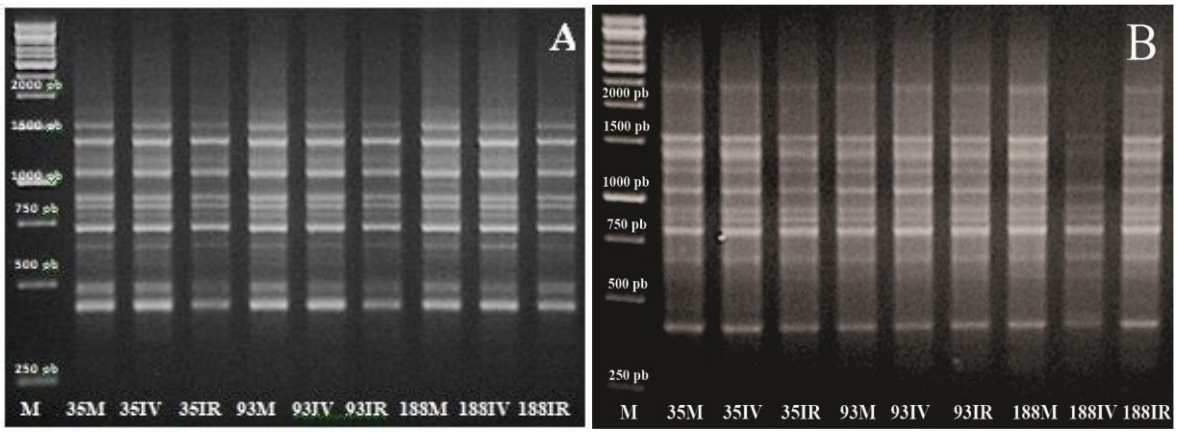


Fig. 4.16. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPG06 (A) și OPG10 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

OPG10 este următorul primer care a generat per total 11 ampliconi cu lungimea acestora cuprinsă între 418 și 2420 pb (Figura 4.16, B). Profilele moleculare sunt similare între genotipuri cu unele excepții pentru 188TR 5021. În profilul electroforetic al formelor genotipului 188TR 5021 a fost identificat fragmentul de 578 pb care lipsește la celelalte probe. Astfel, rezultatele amplificării cu acest primer a diferențiat genotipul 188TR 5021 de Ingen 35 și Ingen 93. În același timp, s-a observat diferențe în profilul molecular al formei 188TR 5021 IV la care nu au fost depistate fragmentele de 1237, 1366 și 2420 pb. Frecvența răspândirii ampliconilor generați de OPG10 a scos în evidență 7 ampliconi comuni și 4 polimorfi, relevând un polimorfism moderat.

Electroforegrama obținută în urma amplificării cu primerul OPH15 (Figura 4.17, A) a pus în evidenţă 7 fragmente, dintre care 5 comune și 2 polimorfe. Dimensiunea fragmentelor este cuprinsă în intervalul de 704 - 1674 pb. Investigarea profilelor moleculare individuale a evidențiat genotipul Ingen 93 IV cu cel mai mare număr de ampliconi (7). La celelalte genotipuri numărul de ampliconi variază între 5-6 fragmente nucleotidice.

Oligomerul OPI16 a evidențiat un polimorfism pronunțat între genotipurile de triticale investigate. Astfel, doar 3 fragmente din 8 identificate per total (Figura 4.17, B) au determinat o frecvență înaltă de răspândire în genomul formelor studiate (comune) și 5 fiind polimorfe. Lungimea ampliconilor obținuți a variat între 455 și 2478 pb.

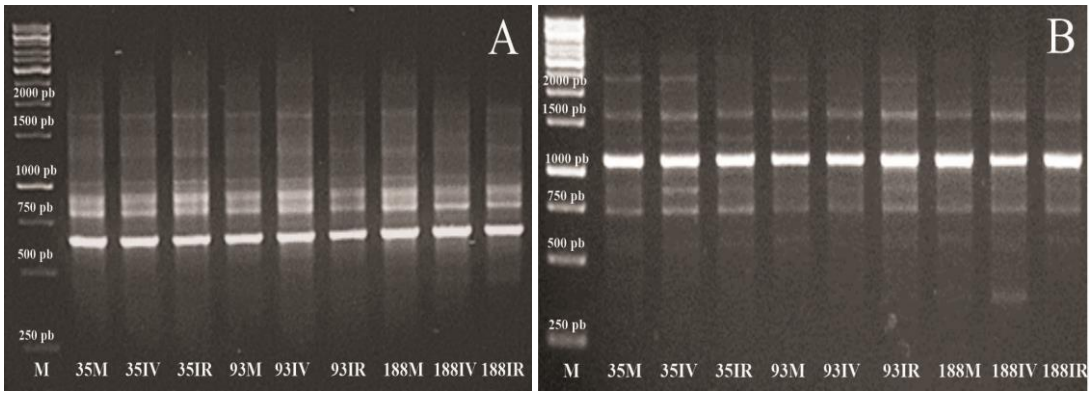


Fig. 4.17. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPH15 (A) și OPI16 (B).

M – marcher molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, **pb** – perechi de baze); genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

Tabelul 4.1. Particularități ale primerilor RAPD analizați la formele de triticale

Primer	Lungimea (*pb*)	Numărul fragmentelor				Polimorfism (%)	PIC
		Total	*comune*	*polimorfe*	*specifice*		
OPA11	477-855	5	4	1	-	20,00	0,04
OPB14	320-1671	6	2	4	-	66,67	0,25
OPC05	372-1251	9	3	4	**2**	66,67	0,37
OPB12	320-1764	16	7	9	-	56,25	0,30
OPC07	295-2891	16	7	7	**2**	56,25	0,39
OPD07	272-1730	8	6	1	**1**	25,00	0,22
OPE17	656-4000	6	5	1	-	16,67	0,04
OPF08	409-1962	11	9	2	-	18,18	0,15
OPG06	429-1513	11	9	1	**1**	18,18	0,21
OPG10	418-2420	11	7	4	-	36,36	0,17
OPH15	704-1674	7	5	2	-	28,57	0,33
OPI16	455-2478	8	3	5	-	62,50	0,49
Total/Media	**272-4000**	**114**	**67**	**41**	**6**	**39,28**	**0,25**

Notă: **pb** – perechi de baze; **PIC** – conținutul informației polimorfe (*Polimorphic Information Content*).

Au fost observate fragmente specifice atât pentru o singură formă, cât și pentru un genotip. În amprenta moleculară a 188TR 5021 IV a fost amplificat fragmentul specific de 455 pb. De asemenea, s-au remarcat formele genotipului Ingen 35 IV și Ingen 35 IR prin prezența fragmentului de 1342 pb iar 188TR 5021 IV și 188TR 5021 IR – 1834 pb. Numărul benzilor electroforetice în profilele moleculare a variat de la 3 (la Ingen 93 IV și 188TR 5021 M) la 6 (la Ingen 35 IV și 188TR 5021 IV).

Studiul variabilităţii genotipurilor de triticale în baza a 12 primeri RAPD a evidențiat prezenţa a 114 fragmente amplificate (Tabelul. 4.1), dintre care 67 s-au dovedit a fi comune și 41 polimorfe, relevând un polimorfism destul de pronunțat de 39%. Dimensiunea produselor PCR a variat între 272 și 4000 pb. Primerul OPE17 a înregistrat cel mai larg interval de valori a masei

moleculare (3344 pb) iar OPA11 cel mai îngust (378 pb), însă ambii oligomeri au amplificat un număr mic de fragmente (6 și 5, respectiv) cu un polimorfism moderat de 17 și 20%, respectiv.

Ampliconii obținuți de fiecare primer individual a variat de la 5 (OPA11) la 16 (OPB12, OPC07). Amorsele OPB12, OPC07, OPF08, OPG06, OPG10 s-au remarcat prin cel mai mare număr de ampliconi generați la formele de triticale analizate (Tabelul 4.1). Numărul variat de benzi polimorfe (de la 1 la 9) în dependență de primer a determinat un nivel, la fel, diferit de polimorfism (17 - 67%). Astfel, 8 oligomeri dintre cei 12 studiați au pus în evidență un polimorfism cu un nivel moderat pentru OPD07 (25%), OPH15 (29%), OPG10 (36%), și un nivel înalt în cazul OPB12 (56%), OPC07 (56%), OPI16 (63%), OPB14 (67%) și OPC05 (67%).

Cei 8 primeri enumerați mai sus se caracterizează și printr-o putere de discriminare a formelor de triticale analizate în baza indicelui PIC (conținutul informației polimorfe) care a cuprins valori între 0,17 (OPG10) și 0,49 (OPI16). Analiza polimorfismului secvențelor nucleotidice a scos în evidență și amorsa OPG06 cu un indice PIC de 0,21. Pentru sistemul de primeri utilizat indicele PIC a înregistrat de la cele mai mici valori de 0,04 pentru OPA11 și OPE17 până la cele mai mari valori de 0,49 în cazul OPI16.

Primerii studiați au diferențiat genotipurile și în baza ampliconilor specifici identificați. Din totalul a 6 fragmente constatate în profilele electroforetice analizate cu 12 amorse RAPD, cele mai multe au fost relevate de primerii OPC05 (2) și OPC07 (2) urmați de OPD07 (1) și OPG06 (1). Generalizând rezultatele genotipării cu 12 primeri RAPD, s-au evidențiat 9 din 12 oligomeri care în conformitate cu parametrii analizați au fost cei mai informativi în discriminarea formelor de triticale studiate.

Analizând amprentele molecular-genetice în baza primerilor RAPD a formelor fiecărui genotip separat, au fost evidențiate un număr mai mare de fragmente la genotipul Ingen 93 (107), dintre care 80 – monomorfe și 27 – polimorfe, indicând și cel mai mare polimorfism genetic de 25%. Un număr proxim de fragmente (101) a fost descris și la formele genotipului 188TR 5021 însă s-au caracterizat prin prezența mai multor benzi comune – 86, comparativ cu cele polimorfe – 15, identificând și cel mai scăzut nivel de polimorfism între genotipurile investigate, 15%. Analiza comparativă a spectrelor electroforetice obținute la formele genotipului Ingen 35 a determinat prezența a 104 fragmente, printre care majoritatea sunt comune – 84, și mai puțin de jumătate sunt polimorfe – 20, cu un polimorfism de 19%.

În același timp, analiza individuală a formelor a depistat cele mai multe fragmente specifice la genotipul Ingen 93 (12), urmat de Ingen 35 (7) și cele mai puține la 188TR 5021 (5). Astfel, primerii care au generat ampliconi specifici pentru o formă sau un genotip au determinat și un nivel de diferențiere genetică înalt: OPB12, OPB14, OPC05, OPC07, OPD07, OPG06,

OPH15 și OPI16. Din setul de decameri utilizați în cadrul acestui studiu în genotiparea formelor de triticale s-au distins 3 grupe care au o pondere mai mare în discriminarea și evidențierea unui polimorfism pronunțat pentru formele genotipului Ingen 35 (OPB12, OPB14, OPC07, OPH15 și OPI16), Ingen 93 (OPB12, OPB14, OPC05, OPC07, OPD07, OPH15 și OPI16) și 188TR 5021 (OPB14, OPG06, OPG10, OPH15 și OPI16).

În baza întregului set de date generat de 12 primeri RAPD, analizând formele genotipurilor studiate, cele mai variate profiluri electroforetice au fost constatate la genotipul Ingen 93 forma *in vitro*. De asemenea, această formă de triticale a prezentat 5 fragmente specifice, cu dimensiune diferită, în funcţie de oligomer. OPC05 și OPC07 au determinat prezența a două fragmente specifice (692, 863 pb, și 1353, 1500 pb, respectiv) urmate de OPD07 cu un singur amplicon specific (1443 pb) (Tabelul 4.2).

Fragmente specifice au fost identificate și la formele genotipului Ingen 35, puse în evidență de primerii OPF08 (754 pb) și OPI16 (1342 pb). Formele genotipului 188TR 5021 au relevat prezența a 5 ampliconi specifici, dintre care 3 au fost caracteristici genotipului fiind evidențiați de OPB12 (1150 pb), OPG10 (578 pb) și OPI16 (1834 pb), iar câte un fragment a fost identificat doar în profilurile formei 188TR 5021 M și 188TR 5021 IV generați de OPG06 (961 pb) și OPI16 (455 pb), respectiv (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Secvențe nucleotidice specifice identificate în baza analizei cu primeri RAPD la genotipurile de triticale

Genotip/ formă	Fragment specific (*pb*)		Total
	formă	genotip	
35M	-	$OPF08_{754}$, $OPI16_{1342}$	**2**
35IV	-		
35IR	-		
93M	-	-	**5**
93IV	$OPC05_{692}$, $OPC05_{863}$, $OPC07_{1353}$, $OPC07_{1500}$, $OPD07_{1443}$		
93IR	-		
188M	$OPG06_{961}$	$OPB12_{1150}$, $OPG10_{578}$, $OPI16_{1834}$	**5**
188IV	$OPI16_{455}$		
188IR	-		

Analiza clusteriană în baza dendogramei (Figura 4.18) generată prin metoda UPGMA (indice de disimilaritate *Jaccard*) a determinat delimitarea genotipurilor de triticale și formele acestora în două clustere principale. S-a observat, că formele genotipurilor Ingen 35 și Ingen 93 s-au grupat împreună, cu excepția formei Ingen 93 IV care înregistrează și cel mai mare indice de distanță genetică (0,26), fapt ce confirmă diversitatea accentuată în profilul genetic al acesteia

și prezența fragmentelor specifice. În cazul formelor genotipului 188TR 5021, care formează un alt cluster (II), s-a atestat o similaritate mai mare, în special între forma martor și iradiată (Figura 4.18). Cea mai mică distanță genetică (0,05) s-a constatat între formele martor și iradiate ale genotipului Ingen 93, indicând asupra unui grad înalt de similaritate a profilurilor electroforetice după majoritatea amorselor RAPD.

O diversitate pronunțată s-a evidențiat în baza analizei UPGMA între formele genotipului Ingen 35 care s-au inclus în grupul I. Printre acestea cea mai diferită genetic în baza primerilor RAPD studiați s-a dovedit a fi forma *in vitro* (Ingen 35 IV) cu un indice de distanță de 0,11.

Generalizând rezultatele genotipării cu primerii arbitrari RAPD, s-au evidențiat 9 primeri (OPD07, OPH15, OPG06, OPG10, OPB12, OPC07, OPI16, OPB14 și OPC05) care în conformitate cu toți parametrii analizați (număr ampliconi total/ 6-16, polimorfi/ 1-9, PIC/ 0,17-0,49), au fost cei mai informativi în discriminarea formelor de triticale studiate.

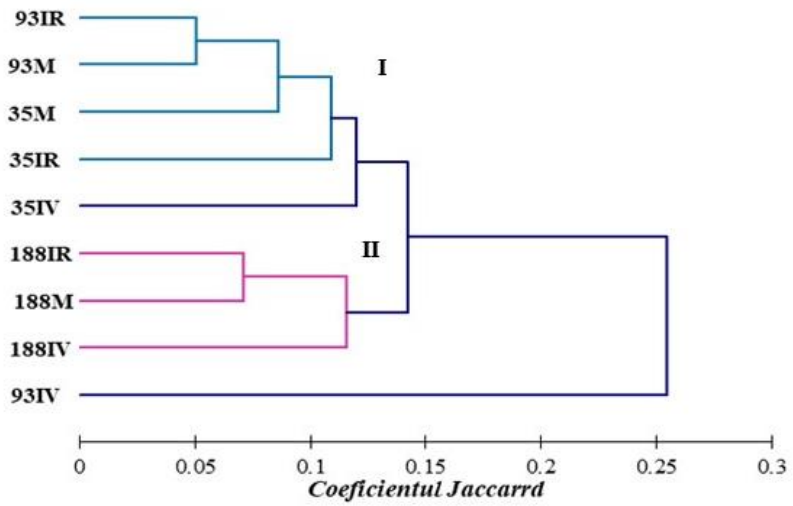


Fig. 4.18. Gruparea formelor de triticale în baza genotipării RAPD prin analiza UPGMA.
(*Unweighted Pair Group Methodwith Arithmetic Mean***)**
Notă: genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

Au fost identificați și clasificați din setul total de primeri cei care au o pondere mai mare în discriminarea și evidențierea unui polimorfism pronunțat pentru formele genotipului Ingen 93 (OPB12, OPB14, OPC05, OPC07, OPD07, OPH15 și OPI16), Ingen 35 (OPB12, OPB14, OPC07, OPH15 și OPI16) și 188TR5027 (OPB14, OPG06, OPG10, OPH15 și OPI16).

Analiza polimorfismului genetic în baza primerilor utilizați a identificat o diversitate genetică mai mare la formele genotipului Ingen 93 (25% polimorfism) comparativ cu formele Ingen 35 (15%) și 188TR 5021 (19%).

A fost constatată o diferențiere genetică pronunțată în cazul spectrelor electroforetice ale formei Ingen 93 *in vitro* confirmată prin numărul de fragmente specifice (5) și cel mai mare indice de disimilaritate (0,26).

Analiza comparativă a amprentelor genetice obținute a pus în evidență o variabilitate semnificativă la formele *in vitro* a genotipurilor studiate, concluzie demonstrată și de distanța genetică în baza indicelui Jaccard: Ingen 35 IV – 0,11; Ingen 93 IV – 0,26; 188TR 5021 IV – 0,12; diferențiindu-le de formele martor și iradiate.

4.3. Expresia caracterelor cantitative ale somaclonelor SC_2 de triticale recuperate din variantele supuse iradierii și culturii *in vitro*

Menținerea diversității genetice este esențială într-un program de ameliorare pentru a asigura o producție durabilă. Amelioratorii au valorificat pe scară largă variația genetică din diferite grupuri de gene pentru a îmbunătăți diversitatea genetică.

Spectrul variabilităţii genotipice la plante este condiţionat nu numai de factorii de inducere şi metodele aplicate, dar şi de natura genetică a materialului iniţial.

Evaluările fenologice comparative asupra fazelor de vegetaţie a somaclonelor SC_2 de triticale au evidenţiat decalaj între stadiile de vegetaţie la faza de vegetaţie: *Înspicat ș*i *Înflorire.* În rezultatul evaluării s-au remarcat variaţii ale stadiilor de vegetaţie în cadrul acestei faze cu 1-2 stadii mai avansate, astfel somaclonele Ingen 93 obținute *in vitro* și varianta martor Ingen 93 se aflau la stadiile 57 conform scării Zadocks, ce corespunde cu *60 % vizibile a inflorescenței,* iar SC_2 Ingen 93 iradiate la stadiul 59 (*apariția completă a inflorescenței)* (Figura 4.19).

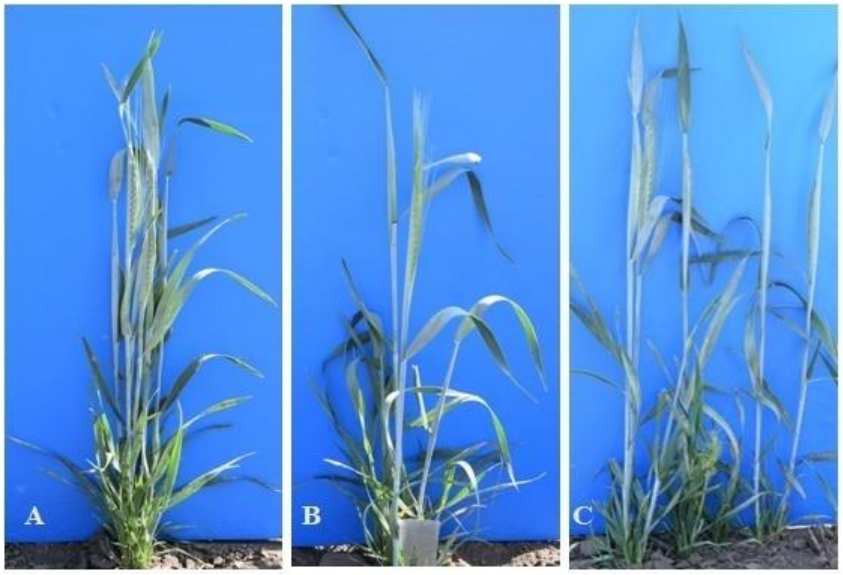


Fig. 4.19. Variantele experimentale a somaclonelor SC_2 a genotipului Ingen 93 la diferite faze de vegetație: A – martor; B – iradiate; C – cultura *in vitro.*

Pentru genotipul 188TR 5021 s-au atestat deferențiere între fazele de vegetație. Varianta martor 188TR 5021, fiind la faza de vegetație *Înflorire,* stadiul de vegetaţie 69 (înflorire completă), somaclonele iradiate și obținute prin cultura *in vitro* 188TR 5021 s-au aflat la faza de vegetaţie *Înspicat,* stadiul de vegetație 53 - 55 (20 - 50% din inflorescențe vizibile) (Figura 4.20).

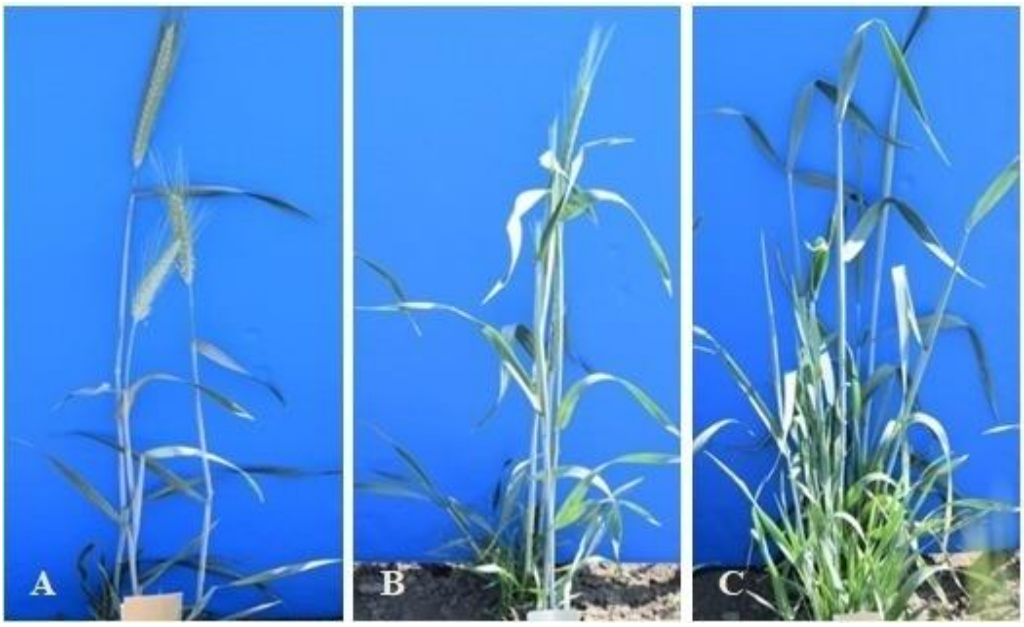


Fig. 4.20. Variantele experimentale a somaclonelor SC_2, genotipul 188TR 5021 la diferite faze de vegetație: A – înflorire completă (martor); B, C – faza de vegetație înspicat; B – iradiat; C – cultura *in vitro.*

Instabilitatea genotipurilor obținute prin cultura *in vitro* este de natură genetică și/sau epigenetică, care poate genera variații somaclonale. Aceste variații includ modificări fenotipice care implică expresia unor gene specifice [115; 200].

Este cunoscut faptul, că cultura *in vitro* poate fi extrem de stresantă și induce efecte mutagenice asupra plantelor.

Analizând trăsăturile morfologice ale spicului la variantele cercetate au fost evidenţiate unele variaţii morfologice ale spicului pentru somaclonele SC_2, obținute prin cultura *in vitro.* Astfel, la genotipul Ingen 93 s-a atestat variaţia morfologică – spic ramificat și apariția spiculețelor secundare (Figura 4.21). Morfologia spicului (inflorescenței) cerealelor cu boabe mici, inclusiv triticale, este un factor cheie în determinarea randamentului de boabe. Pentru a produce soiuri cu cea mai eficientă producție de cereale în diferite medii, uniformitatea morfologiei spicului este cea mai importantă problemă [190].

Ulterior, au fost colectate plantele în faza de vegetaţie: *Maturitatea deplină,* stadiul de vegetaţie: *Semințe ieșite din repausul germinativ secundar* (99) și evaluaţi parametrii morfometrici ce prezintă interes agronomic.



Fig. 4.21. Variația morfologică a spicului la somaclonele SC_2, genotipul Ingen 93: A – martor; B, C – variantele *in vitro*; B – spic ramificat; C – apariția spiculețelor secundare.

Identificarea și evaluarea trăsăturilor agronomice și a caracterelor de producție sunt importante pentru clasificarea resurselor de germoplasmă și ameliorarea culturilor. Caracterele cantitative sunt determinate de multiple gene distribuite în genom, iar expresia valorică reflectă interacțiunile genice, dar și selecția individuală ca rezultat al interrelațiilor cu mediul. Similaritatea dintre indivizi după anumite însușiri depinde de gradul de înrudire și amplitudinea variației genetice care stă la baza caracterului [1].

Pentru aprecierea varialibității somaclonale precum și varianta martor au fost evaluați un șir de parametrii morfologici: talia plantei, numărul de frați fertili, lungimea spicului, lungimea ultimului internod, precum și caracterele productivității (numărul de boabe per spic, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe).

În rezultatul evaluărilor biomorfologice s-a estimat variația semnificativă a valorilor medii a caracterelor agromorfologice la somaclonele SC_2 de triticale, în dependență de genotip, factorii luați în studiu și caracterul analizat.

Evaluarea gradului de variabilitate a caracterului *numărul de frați fertili per plantă* a evidențiat reacție specifică pentru fiecare genotip studiat, cât și a factorului luat în studiu, confirmând cele relatate de alți autori [161]. S-au constatat valori maxime pentru genotipurile Ingen 93*(in vitro)* cu 92% și 188TR (RAD) cu 85% în comparație cu martorul, diferențele fiind semnificative la nivel de 95 - 99,9%. Evaluarea gradului de variabilitate pentru caracterul *numărul de frați fertili per plantă*, a atestat o variație puternică (58,66 - 151,47%) (Tabelul 4.3).

Tabel 4.3. Variația caracterelor *numărul de frați fertili, talia plantei, lungimea spicului principal* și *lungimea ultimului internod* la somaclonele SC_2 de triticale

Caracterul / Genotipul	Numărul de frați fertili		Talia plantei (cm)		Lungimea spicului principal (cm)		Lungimea ultimului internod	
	$\bar{x}$ ± ES	CV,%	$\bar{x}$ ± ES	CV,%	$\bar{x}$ ± ES	CV,%	$\bar{x}$ ± ES	CV,%
Martor Ingen 35	0,86±0,13	84,26	75,93±2,04	14,75	13,20±0,22	9,14	26,16±0,91	19,10
RAD Ingen 35	0,56±0,15	151,47	**61,75±2,77 *****	**24,61**	12,43±0,36	16,00	**21,59±0,36 ****	**34,61**
In vitro Ingen 35	0,9±0,16	98,30	69,31±2,62	20,73	13,75±0,38	15,35	25,25±1,41	30,70
Martor Ingen 93	0,76±0,12	88,55	69,88±0,97	7,62	13,21±0,11	4,83	24,03±0,65	14,95
RAD Ingen 93	0,95±0,21	106,79	68,73±3,96	27,63	12,73±0,38	14,48	23,82±1,89	38,09
In vitro Ingen 93	**1,46±0,15 *****	**58,66**	**79,11±1,38 *****	**9,56**	**15,21±0,3 *****	**10,97**	25,61±0,63	13,56
Martor 188TR5021	0,6±0,12	107,58	69,82±2,57	18,45	12,44±0,34	13,74	24,3±1,28	26,51
RAD 188TR5021	**1,11±0,15 ***	**72,05**	**82,5±3,21 ****	**20,26**	**15,03±0,42 *****	**14,55**	**33,07±1,68 *****	**26,40**
In vitro 188TR5021	0,96±0,18	103,38	71,85±2,13	16,29	**14,53±0,36 *****	**13,81**	23,21±1,16	27,43

Notă: *, **, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Caracterul *talia plantei* a indicat valori medii mai mari cu 13 - 18%, față de martor la genotipul Ingen 93 (*in vitro*) și 188TR (RAD) semnificative la nivel de 99 - 99,9%. Valoare maximă a caracterului talia plantei (82,5 cm) a prezentat genotipul 188TR (RAD). La varianta Ingen 35 iradiată cu raze gama s-au înregistrat valori medii mai mici față de martor cu 18,68 %. Aceste somaclone s-au evidențiat prin talia plantelor, media constituind 61,75 cm. Constatări similare sunt raportate de alți autori, inclusiv la triticale. Tulpina sau paiul de triticale constă din mai multe internoduri (de obicei 5-7) cu lungime crescândă spre vârf. De regulă, paiele au o lungime de 50 (60) cm până la 150 cm [161]. Coeficientul de variație a atins valori mici și medii (9,56 - 24,61%), indicând similitudinea indivizilor după caracterul *talia plantei*.

De asemenea, s-a înregistrat micșorarea valorilor medii a caracterului *lungimea ultimului internod* la variantele supuse iradierii cu raze gama. Cele mai mici valori medii a înregistrat genotipul Ingen 35 (RAD), constituind 18% (21,59cm), fiind semnificative la nivel de 99%, iar pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), s-au atestat valori mai mari a caracterului cu 36% față de martor, fiind semnificativ - 99,9%.

Valoarea medie pentru caracterul *lungimea spicului principal* a atestat o specificitate genotipică. S-au constatat valori medii mai înalte cu 15 - 20% pentru genotipurile Ingen 93 *(in vitro*) și 188TR 5021 (RAD și *in vitro*) în comparație cu martorul, diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%. La somaclonele studiate s-a obținut variabilitatea lungimii spicului de la 12 -

15 cm. Cea mai înaltă valoare a caracterului *lungimea spicului principal* (15,21 cm) s-a înregistrat pentru somaclonele Ingen 93 (*in vitro*). Pentru genotipul Ingen 35 nu s-au evidențiat deosebiri semnificative ale caracterului dat.

Datele din literatură caracterizează triticalele prin spice de lungime considerabilă. Cel mai frecvent, soiurile noi create formează spice de la 12 până la 14 cm lungime [160]. Coeficientul de variație a acestui indice a constituit 9,14 - 16%, ceea ce corespunde cu un nivel mic și mediu de variabilitate (Tabelul 4.3).

O caracteristică economică importantă a triticalelor este numărul de boabe per spic și greutatea acestora. Studiile actuale indică, că capacitatea genetică de formare a 30 și mai multe boabe per spic este tipică pentru triticale [132]. În rezultatul aprecierii variațiilor somaclonale s-a atestat o variabilitate sporită după caracterele productivității: numărul de boabe per spic, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe.

Rezultatele obținute pentru caracterul *numărul de boabe per spic principal* a indicat valori medii mai mari cu 24%, față de martor la genotipul Ingen 93 (*in vitro*), semnificativ (99%). Aceste somaclone au înregistrat și cele mai mari valori (75,4) a caracterului respectiv, numărul de boabe per spic a ajuns la 124 de boabe. Efectul radiației gama s-a remarcat și asupra indicelui *numărul de boabe per spic principal*. S-au atestat diferențe semnificative (95%), cu 21% mai mici în comparație cu martorul pentru genotipul Ingen 35 (RAD), valorile medii fiind cele mai mici (60,2). Evaluarea variabilității caracterului *numărul de boabe per spic principal* a atestat o variație extinsă (20,81 - 58,40%) (Tabelul 4.4).

Cercetările au relevat diferențe semnificative dintre variante la nivel de 95 - 99% pentru caracterul *greutatea boabelor* la toate genotipurile în comparație cu martorul. Radiația gama a influențat caracterul *greutatea boabelor*. Cea mai mare valoare a acestui caracter față de martor a fost remarcată pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), constituind 50%, greutatea boabelor depășește pragul de 3,0 g. Valori medii mai mici cu 31,3 - 43% față de martor, s-au constatat pentru genotipurile Ingen 93 (RAD) și Ingen 35 (RAD), diferențele fiind semnificative – 99 - 99,9%. Cultura *in vitro* a acționat specific asupra acestui caracter. Somaclonele SC_2 Ingen 93 (*in vitro*) au avut valori mai mari cu 21% față de martor, greutatea boabelor constituind în medie 3,39g, semnificativă la nivel de 95%. Valori medii mai mici de 1,66 ori față de martor, s-au stabilit la genotipurile Ingen 35 (*in vitro*), fiind semnificative la nivel de 99,9%. Coeficientul de variație a atins valori mari (22,98 - 77,56%), ceea ce denotă o variabilitate mare a acestui caracter.

Tabelul 4.4. Variația caracterelor productivității la somaclonele SC_2 de triticale

Caracterul / Genotipul	Numărul de boabe/spic		Greutatea boabelor (g)		Masa a 1000 boabe (g)	
	$\bar{x}$ ± ES	CV,%	$\bar{x}$ ± ES	CV,%	$\bar{x}$ ± ES	CV,%
Martor Ingen 35	75,66±4,10	29,73	3,52±0,23	36,16	46,39±1,43	15,42
RAD Ingen 35	**60,2±6,41 ***	58,40	**2,04±0,28 *****	77,56	**32,06±0,23 *****	22,07
In vitro Ingen 35	64,06±5,08	43,46	**2,12±0,26 *****	69,37	**34,63±2,30 *****	33,21
Martor Ingen 93	60,76±2,30	20,81	2,78±0,11	22,98	45,84±1,06	11,57
RAD Ingen 93	51,95±5,46	50,46	**1,91±0,26 ****	66,46	**34,85±2,37 *****	34,12
In vitro Ingen 93	**75,4±4,18 ****	30,39	**3,39±0,24 ***	39,69	44,60±1,34	15,03
Martor 188TR 5021	70,04±5,57	39,77	2,03±0,23	58,86	27,98±1,67	29,93
RAD 188TR 5021	71,92±5,84	42,25	**3,05±0,28 ***	48,82	**38,90±1,61** ***	20,69
In vitro 188TR 5021	58,56±4,69	43,86	2,0±0,20	55,02	**32,95±1,13 ***	17,19

Notă: * ,**, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Radiația gama a contribuit la majorarea coeficientului de variație a caracterului *masa a 1000 boabe* de 1,43 - 2,94 ori la genotipurile Ingen 35 (RAD) și Ingen 93 (RAD) în comparație cu varianta martor, iar la genotipul 188TR 5021, coeficientul de variație s-a diminuat față de martor de 1,74 ori. Acest fapt indică despre particularitățile genotipice și reactivitatea specifică a fiecărui genotip. Pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), valorile medii au crescut cu 39,02% față de martor, iar pentru genotipul Ingen 35 (RAD), valorile medii s-au micșorat față de martor cu 30,9%, diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%.

Acțiunea culturii *in vitro* asupra caracterului *masa a 1000 boabe* a atestat valori medii mai mari cu 17% pentru genotipul 188TR 5021 (*in vitro*) față de martor semnificativ 95%. Pentru genotipul Ingen 35 (*in vitro*), valorile medii au scăzut față de martor cu 25,36%, diferențele fiind semnificative la nivel de 99,9%. Coeficientul de variație a constituit 15,03 - 33,21%, ceea ce corespunde unui nivel mediu – înalt de variabilitate.

Aplicarea testului ANOVA a permis evaluarea contribuţiei procentuală a genotipului, factorii studiați și interacțiunea dintre genotip și factori asupra variației caracterelor cantitative la somaclonele SC_2 de triticale (Anexa 6).

Cercetările efectuate au pus în evidenţă influenţa prioritară a genotipului cu factorii analizați, interacțiunea fiind semnificativă la nivel de 95 - 99,9%. Acțiunea maximală a manifestat-o interacțiunea genotipului cu radiația gama, puterea de influență constituind 3,40 - 31,93%. Valorile cele mai mari au fost atestate la caracterele productivități: *masa a 1000 boabe*

(28,17%) și *numărul de boabe per spic* (31,93%), diferențele fiind semnificative (P≤0,001). Interacțiunea genotipului cu cultura *in vitro*, a atins valori de la 2,92 - 10,99%, în dependență de caracter. Valorile cele mai înalte au fost înregistrate pentru caracterele: *talia plantei* (8,87%), *greutatea boabelor* (10,35%) și *masa a 1000 boabe* (10,99%), semnificative la nivel de 99,9%.

Genotipul nu a avut o influență semnificativă pentru toate caracterele studiate. Puterea de influență maximală a manifestat-o genotipul pentru caracterele: *greutatea boabelor* (15,01%) și*masa a 1000 boabe* a somaclonelor obținute prin cultura *in vitro*, constituind 34,63%, diferențele fiind semnificative (99,9%). Pentru somaclonele iradiate, contribuția genotipului a atins valori de la 4,02 - 14,58%. Cele mai înalte valori a acestui indice, semnificative (P≤0,001) au fost remarcate pentru caracterele: *masa a 1000 boabe* (8,22%) și *numărul de boabe per spic* (14,58%).

Cultura *in vitro* a avut impact semnificativ la nivel de 95 - 99,9% și a atins valori de la 1,62 - 28,88%. Pentru caracterul *lungimea spicului principal* s-au remarcat cele mai mari valori, putere de influenţă deţinând 28,88%.

Puterea de influență a radiației asupra însușirilor analizate a avut valori mici pentru majoritatea caracterelor. Semnificative au fost doar pentru indicii: *greutatea boabelor* (2,60 %), *lungimea spicului principal* (2,89%), *numărul de boabe per spic* (4,08%). Cea mai mare valoare s-a atestat la caracterul masa a 1000 boabe, constituind 5,18%.

Analiza datelor experimentale prin aplicarea testului ANOVA, denotă că asupra variației caracterelor cantitative la somaclonele SC_2 de triticale o are genotipul, factorii luați în studiu (RAD și cultura *in vitro*) cât și interacțiunea dintre genotip și factori, diferențele fiind semnificative la nivel de 95 - 99,9% (Anexa 6).

În rezultatul cercetărilor s-au evidențiat somaclonele (SC_2) a genotipului Ingen 93 (*in vitro*) și 188TR 5021 (RAD). Toate caracterele au avut valori mai mari decât martorul, semnificative (95 - 99,9%) determinative fiind 5 însușiri biomorfologice: *talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe, greutatea boabelor* și *masa a 1000 boabe*.

Pentru genotipul Ingen 35 (RAD) s-a stabilit o reducere semnificativă a caracterelor: *talia plantei, lungimea ultimului internod, numărul de boabe per spic* și *greutatea boabelor* în comparație cu martorul.

Rezultatele obținute confirmă eficacitatea factorilor cercetați în extinderea variabilității genetice la triticale, date ce argumentează necesitatea utilizării somaclonelor în următoarele generații în vederea selectării genotipurilor cu caractere performante.

4.4. Studiul variabilității fenotipice și genotipice a unor caractere cantitative ale somaclonelor SC_1 și SC_2 de triticale

Potențialul genetic al plantelor poate fi evaluat prin studiul variației genotipice și fenotipice a caracterelor cantitative [106]. Caracterele genetice sunt în mare parte guvernate de poligene și sunt puternic influențate de mediu. Variația genetică a oricărui caracter cantitativ este constituită din varianța aditivă (ereditară) și varianța non-aditivă [90]. Studiul parametrilor genetici: variației fenotipice și genotipice, heritabilității și avantajului genetic, coeficientului de variație genotipică și fenotipică a caracterelor ce țin de arhitectura plantei și a productivității vor asigura condițiile optime pentru evidențierea caracterelor prețioase în ameliorarea triticalelor.

Analiza variației a fost efectuată pentru 7 caractere cantitative: numărul de frați fertili, talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, numărul de boabe/spic, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe, incluzând cercetările asupra somaclonelor pe parcursul a doi ani. Rezultatele au evidențiat o contribuție semnificativă asupra indicilor biomorfologici condiționată de generațiile SC_1, SC_2 și efectul acțiunii condițiilor climatice ale anului.

Pentru genotipul Ingen 35, analiza variației a relevat diferențe semnificative pentru $P \leq 0,05$; 0,01; 0,001 a caracterelor *talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, numărul de boabe/spic, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe*, indicând prezența unei variabilități genetice semnificative stabile pentru ambele generații (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Analiza variației indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului Ingen 35 (testul ANOVA)

Caractere cantitative	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Media pătratică	Rezidual	Total	Testul Fisher (F)	PI, %
Ingen 35 SC_1 (2021)							
NrFF	0,9867	2	0,49	0,59	44,34	0,82	2,22
TPl	5701,69	2	2850,85	50,81	9359,36	58,12***	**60,91**
LgSP	32,06	2	16,03	1,17	116,62	13,65***	27,49
LgUint	196,44	2	98,22	8,23	788,9	11,94***	24,90
NrB	1684,88	2	842,44	160,96	13274,3	5,23*	12,69
GB	3,7684	2	1,88	0,31	26,18	6,05**	14,39
MMB	2805,7	2	1402,85	188,37	16368,6	7,45***	17,14
Ingen 35 SC_2 (2022)							
NrFF	0,9867	2	0,49	0,69	50,75	0,71	1,94
TPl	2371,21	2	1185,6	163,1	14114,1	7,27***	16,80
LgSP	30,7251	2	15,36	2,42	204,85	6,35**	14,99
LgUint	303,61	2	151,81	43,42	3429,66	3,50*	8,85
NrB	2997,95	2	1498,97	675,88	51661,8	2,22	5,80
GB	32,0451	2	16,02	1,83	163,71	8,76***	19,57
MMB	2920,94	2	1460,47	77,9	8529,59	18,75***	**34,24**

Notă: * ,**, *** – diferențe semnificative pentru $P \leq 0,05$; 0,01; 0,001.

NrFF - numărul de frați fertili; **TPl** - talia plantei, cm; **LgSP** - lungimea spicului principal, cm; **LgUint** - lungimea ultimului internod, cm; **NrB** - numărul de boabe/spic; **GB** - greutatea boabelor, g; **MMB** - masa a 1000 boabe, g.

În dependență de caracter, pentru somaclonele SC_1 puterea de influență a atins valori de la 12,69 - 60,91%. Valorile cele mai înalte au fost înregistrate pentru însușirile: *lungimea ultimului internod* (24,90%), *lungimea spicului principal* (27,49%), și *talia plantei* (60,91%). La somaclonele SC_2, puterea de influență a variat de la 8,85 - 34,28%, s-au evidențiat valorile pentru caracterele productivității: *greutatea boabelor* (19,58%) și *masa a 1000 de boabe* (34,24%).

Valorile caracterului *numărul de frați fertili* au fost nesemnificative față de martor în ambele generații, aceasta indică faptul că genotipul pentru acest indice a avut un răspuns identic pe parcursul celor doi ani de studiu.

Media pătratică pentru genotipul Ingen 93 a înregistrat diferențe statistic confirmate pentru $P \leq 0,05$; 0,001 la majoritatea caracterelor cantitative în ambele generații (Tabelul 4.6). Puterea de influență a variat de la 10,63 - 53,72% pentru somaclonele SC_1, cele mai mari valori s-au atestat la indicele *numărul de boabe/per spic*, iar pentru somaclonele SC_2, cea mai mare putere de influență s-a remarcat la caracterul *lungimea spicului principal* (42,72%).

Pentru caracterele *numărul de frați fertili* (SC_1) și *lungimea ultimului internod* (SC_2) s-au înregistrat valori nesemnificative.

Tabelul 4.6. Analiza varianței indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului Ingen 93 (testul ANOVA)

Caractere cantitative	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Media pătratică	Rezidual	Total	Testul Fisher (F)	PI, %
Ingen 93 SC_1 (2021)							
NrFF	0,9867	2	0,49	0,27	20,67	1,80	4,77
TPl	3726,69	2	1863,34	131,24	13176,1	14,20***	28.28
LgSP	14,8811	2	7,44	1,74	139,9	4,29*	10,63
LgUint	300,56	2	150,28	11,48	1126,95	13,09***	26,67
NrB	33037,8	2	16518,9	395,17	61490,1	41,80***	**53,72**
GB	6,8744	2	3,44	0,43	37,95	7,96***	18,11
MMB	645,53	2	322,77	42,7	3720,13	7,56***	17,35
Ingen 93 SC_2 (2022)							
NrFF	5,04	2	2,52	0,76	60,08	3,30*	8,38
TPl	2238,18	2	1119,09	136,17	12042,6	8,22***	18,58
LgSP	111,39	2	55,7	2,07	260,7	26,86***	42,72
LgUint	62,2067	2	31,1	33,8	2495,79	0,92	2,49
NrB	9896,19	2	4948,09	465,68	43425,1	10,63***	22,78
GB	37,3931	2	18,7	1,33	133,04	14,07***	**28,10**
MMB	1811,53	2	905,76	71,53	6961,84	12,66***	26,02

Notă: * ,**, *** – diferențe semnificative pentru $P \leq 0,05$; 0,001.

NrFF - numărul de frați fertili; **TPl** - talia plantei, cm; **LgSP** - lungimea spicului principal, cm; **LgUint** - lungimea ultimului internod, cm; **NrB** - numărul de boabe/spic; **GB** - greutatea boabelor, g; **MMB** - masa a 1000 boabe, g.

Tabelul 4.7. Analiza varianței indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale a genotipului 188TR 5021(testul ANOVA)

Caractere cantitative	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Media pătratică	Rezidual	Total	Testul Fisher (F)	PI, %
188 TR 5021 SC_1 (2021)							
NrFF	51,7067	2	25,85	0,66	99,55	38,91***	51.94
TPl	14990,1	2	7495,06	115,15	23281,2	65,09***	**64,38**
LgSP	132,34	2	66,17	2,67	324,56	24,79***	40,77
LgUint	2294,98	2	1147,49	29,36	4409,24	39,08***	52,04
NrB	37123,3	2	18561,7	374,54	64089,9	49,56***	57,92
GB	75,1843	2	37,59	0,86	137,31	43,57***	54,75
MMB	1507,58	2	753,79	100,07	8712,57	7,53***	17,30
188 TR 5021 SC_2 (2022)							
NrFF	3,9467	2	1,97	0,68	53,15	2,89	7,42
TPl	2173,61	2	1086,8	176,24	14862,7	6,17**	14,62
LgSP	114,29	2	57,14	3,67	378,75	15,56***	**30,17**
LgUint	1311,53	2	655,76	48,82	4826,39	13,43***	27,17
NrB	2247,44	2	1123,72	720,03	54089,7	1,56	4,15
GB	17,2232	2	8,61	1,58	131,21	5,44**	13,12
MMB	1492,65	2	746,33	55,72	5504,66	13,39***	27,11

Notă: * ,**, *** – diferențe semnificative pentru P≤0,01; 0,001.
NrFF - numărul de frați fertili; **TPl** - talia plantei, cm; **LgSP** - lungimea spicului principal, cm; **LgUint** - lungimea ultimului internod, cm; **NrB** - numărul de boabe/spic; **GB** - greutatea boabelor, g; **MMB** - masa a 1000 boabe, g.

Analiza varianței pentru genotipul 188TR 5021 a relevat efectul generațiilor și a anului asupra indicilor biomorfologici (Tabelul 4.7). Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative la nivel de 99,9% pentru toate caracterele somaclonelor SC_1. Puterea de influență a atins valori 17,30 - 64,38%. Valoarea cea mai mare s-a remarcat la caracterul *talia plantei* (64,38%).Valorile testului Fisher pentru somaclonele SC_2 atestă un suport statistic P≤0,01; 0,001 pentru caracterele: *talia plantei, lungimea spicului principal, lungimea ultimului internod, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe.* Indicii *numărul de frați fertili* și *numărul de boabe* fiind nesemnificative.

Pentru caracterele analizate, s-au înregistrat, în dependență de an, diferenţe semnificative pentru toate caracterele. Acestea confirmă diversitatea pronunţată a condiţiilor climatice ale celor doi ani experimentali. De asemenea, între genotipuri s-au constatat distincții fenotipice pentru majoritatea caracterelor cantitative analizate.

Cunoașterea contribuției factorilor genetici și de mediu, dar mai ales, evidențierea aportului interacțiunii lor la realizarea fenotipică a caracterelor cantitative, prezintă o importanță majoră în procesul de ameliorare a plantelor [23].

Rezultatele obținute cu privire la varianța genotipică și fenotipică la genotipul Ingen 35 au scos în evidență pentru *talia plantei*, cele mai mari valori la ambele generații de somaclone

SC_1 (Vg=112; Vph=114,03), SC_2 (Vg=40,90; Vph=47,42) (Tabelul 4.8), iar cele mai mici pentru *lungimea spicului principal*, SC_1 (Vg=0,57; Vph=0,64), SC_2 (Vg=0,52; Vph=0,61).

Tabelul 4.8. Estimarea variației și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 35

Caracterul / Parametri	TPl		LgSP		LgUint	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie± ES	90,08±1,30	71,89±1,59	11,78±0,14	13,52±0,19	25,12±0,38	25,30±0,79
Min ÷ max	69÷111	43÷105,5	9÷14,5	11÷17,7	16,5÷31,5	11÷43,5
Vg	112,00	40,90	0,57	0,52	3,60	4,34
Vph	114,03	47,42	0,64	0,61	3,93	6,07
CVG,%	11,75	8,90	6,42	5,32	7,55	8,23
CVF,%	11,86	9,58	6,80	5,80	7,89	9,74
h^2,%	**98,22**	86,24	89,12	84,26	91,62	71,40
AG	21,61	12,23	1,47	1.36	3,75	3,62
AG%	23,99	17,02	12,48	10,06	14,89	14,32

Notă: Caractere: **TPl** - talia plantei, cm; **LgSP -** lungimea spicului principal, cm; **LgUint -** lungimea ultimului internod, cm. În tabelele 4.10 - 4.15 parametrii: **Vg** - varianța genotipică; **Vph** - varianța fenotipică; **CVG,%** - coeficientul de variație genotipică; **CVF,%** - coeficientul de variație fenotipică; **h^2,%** - heritabilitatea în sens larg; **AG** - avantajul genetic; **AG,%** - avantajul genetic ca medie procentuală.

Analizând valorile pentru caracterele productivității, s-a observat menținerea aceleași tendințe, valorile variației genotipice fiind mai mari decât al celei fenotipice (Tabelul 4.9). Cele mai înalte valori se atestă la somaclonele SC_2 pentru caracterul *masa a 1000 de boabe* (Vg=55,30; Vph=58,42), SC_1 (Vg=48,58; Vph=56,11). Valorile cele mai mici s-au remarcat pentru *greutatea boabelor* SC_1 (Vg=0,06; Vph=0,68), SC_2 (Vg=0,57; Vph=0,64).

Tabelul 4.9. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 35

Caracter / Parametri	NrB		GB		MMB	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie± ES	18,32±1,55	73,61±3,05	0,71±0,07	2,90±0,17	32,94±0,38	37,70±1,24
Min ÷ max	0÷46	9÷151	0÷2,1	0,2÷6,8	0÷100	15÷62,22
Vg	27,26	32,92	0,06	0,57	48,58	55,30
Vph	33,70	59,96	0,08	0,64	56,11	58,42
CVG,%	28,50	7,79	35,20	26,00	21,16	19,73
CVF,%	31,69	10,52	38,53	27,62	22,74	20,27
h^2,%	80,89	**54,91**	83,48	88,59	86,57	94,67
AG	9,67	8,76	0,47	1,46	13,36	14,91
AG%	52,80	11,90	**66,25**	50,40	40,56	39,54

Notă: Caractere: **NrB** - numărul de boabe/spic; **GB** - greutatea boabelor, g; **MMB** - masa a 1000 boabe, g.

În studiul de față, s-a remarcat că variabilitatea fenotipică este mult mai mare decât variabilitatea genotipică, pentru *numărul de boabe per spic* a somaclonelor SC_2 (Vg=32,92;

Vph=59,96), ceea ce reflectă influența mediului asupra acestui caracter, fapt demonstrat și de alți cercetători la grâu și triticale [19; 237].

Datele prezentate în tabelele 4.8 - 4.9 au înregistrat diferențe mici ale valorilor coeficientului de variație fenotipică (CVF) față de coeficientul de variație genotipică (CVG), ceea ce indică că variația nu a fost influențată de condițiile de mediu, dar este dependentă de genotip. Cele mai mari valori CVG și CVF au fost înregistrate pentru caracterele de productivitate a somaclonelor SC_1: *greutatea boabelor*, (CVG=35,20%; CVF=38,53%) și *numărul de boabe per spic* (CVG=28,50%; CVF=31,69%). *Lungimea spicului principal* a avut valori minime (CVG=5,32%, CVF=5,80%) la somaclonele SC_2.

Este cunoscut faptul că, indicele numărul de boabe per spic reprezintă cea mai importantă constantă în producția de boabe. Caracterul greutatea boabelor este puternic influențat de condițiile mediului, deoarece necesită o perioadă mai lungă de formare. Acțiunea negativă a stresului biotic și abiotic în timpul procesului de acumulare, umplere și maturitate deplină a boabelor poate influența producerea de boabe [23].

Rezultate similare pentru variația genetică au fost obținute și de alți autori [177]. Atât genotipurile de grâu, cât și cele de triticale au o variabilitate genetică semnificativă a caracterelor productivității și celor ce determină indirect această însușire [329]. Variabilitatea poate fi utilizată pentru a îmbunătăți în continuare genotipurile de grâu și a crea hibrizi de triticale [114].

Evaluarea heritabilității este folosită ca instrument predictiv în ameliorarea plantelor pentru a exprima fiabilitatea valorilor fenotipice. Heritabilitatea în sens larg (h^2) reflectă potenţialul de transmitere ereditară a fiecărui caracter. Pentru caracterele ce țin de arhitectura plantei se atestă valori ridicate: *lungimea spicului principal* (89,12%), *lungimea ultimului internod* (91,62%) şi *talia plantei* (98,22%) la somaclonele SC_1 (Tabelul 4.8). Valori înalte ale heritabilității au fost identificate pentru talia plantei la grâu și triticale și de alți cercetători [237]. Coeficientul de heritabilitate pentru caracterele productivității la somaclonele SC_2 au atestat valori înalte pentru greutatea boabelor (88,59%) și *masa a 1000 de boabe* (94,67%). Valori mai moderate s-au estimat pentru caracterul *numărul de boabe per spic* (54,91%) (Tabelul 4.11).

Heritabilitatea ridicată indică o influență mai mică a mediului și mai mare a genotipului în manifestarea caracterului. Cu cât valorile indicelui de heritabilitate sunt mai mari, cu atât procedurile de selecție sunt mai simple. Moștenirea în sens larg indică doar dacă există o variație genetică suficientă într-o populație și cum va răspunde populația la presiunea de selecție [186].

Avantajul genetic (AG) este un parametru de selecție important, prin care se poate prezice gradul de îmbunătățire a caracterelor țintă [301] și ca medie procentuală a fost clasificat drept scăzut (0-10%), moderat (10-20%) și ridicat (>20%) [106]. Eficiența heritabilității crește

atunci când este cuplată cu un avantaj genetic ridicat ce oferă cea mai eficientă condiție pentru selecție și indică prezența genelor aditive în moștenirea caracterelor [186].

Rezultatele obținute evidențiază o heritabilitate înaltă asociată cu contribuția avantajului genetic sporit la somaclonele SC_1 pentru caracterul *greutatea boabelor* (h^2=83,48%, AG=66,25%) și *numărul de boabe per spic* (h^2=80,89%, AG=52,80%), indicând importanța acestor indici pentru triticale. Cele mai mici valori ale avantajului genetic s-au atestat la somalonele SC_2 pentru *lungimea spicului principal* (AG=10,06%), fiind considerate valori medii. Coeficienții de variație fenotipici și genotipici, heritabilitatea și avantajul genetic au fost utilizați pe scară largă la grâu pentru a evalua amploarea variației materialului de reproducere, pentru a determina procedurile de selecție adecvate și pentru a prezice avansul de ameliorare în îmbunătățirea caracterelor importante [83].

Analizând datele pentru genotipul Ingen 93, observăm valori mari între varianța genotipică și cea fenotipică pentru mai multe caractere: *talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe per spic, masa a 1000 de boabe* (Tabelul 4.10 – 4.11). Cele mai mari valori, au fost estimate pentru *numărul de boabe per spic* la somaclone SC_1 (Vg=644,95; Vph=660,76) și SC_2 (Vg=179,30; Vph=197,92). Pentru indicele *greutatea boabelor* la somaclonele SC_1 s-au atestat valori mici ale variației genotipice și fenotipice (Vg=0,12; Vph=0,14). Acest lucru determină că variația mediului este un factor major care contribuie la variația caracterului.

Examinând toate caracterele luate în studiu, observăm că diferențele dinte valorile coeficientului de variație genotipică (CVG) și coeficientului de variație fenotipică (CVF) pentru genotipul Ingen 93 sunt mici, demonstrând că variația este dependentă prioritar de genotip.

Valorile cele mai mari ale CVG și CVF s-au atestat pentru indicii productivității (Tabelul 4.10). S-a evidențiat caracterul *numărul boabelor* (CVG=52,00%; CVF=52,63%) pentru somaclonele SC_1 și *greutatea boabelor* (CVG=30,58%; CVF=31,73%) la somaclonele SC_2. Pentru caracterele: *talia plantei, lungimea spicului principal* și *lungimea ultimului internod*, valorile coeficienților de variație genotipică și fenotipică au fost mici și medii.

În baza rezultatelor obținute, s-a stabilit că valori majore ale heritabilității au fost înregistrate pentru toate caracterele (>60%), excepție pentru indicele *lungimea ultimului internod,* care a prezentat valori negative la somaclonele SC_2.

Heritabilitatea negativă (-8,67%) cu CVF mediu (4,52%), cuplată cu avantajul genetic negativ (-0,81%) pentru caracterul *lungimea ultimului internod* poate indica acțiunea genelor non-aditive care condiționează acest indice și este în mare parte influențat de condițiile mediului, constatare similară a fost raportată și pentru hibrizii porumbului (*Zea mays* L.) [204].

Tabelul 4.10. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 93

Caracter / Parametri	TPl		LgSP		LgUint	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie±ES	105,95±1,54	73,16±1,47	11,97±0,16	13,81±0,22	31,31±0,38	24,55±0,67
Min ÷ max	66,5÷132	43,5÷105,5	7÷14,5	10÷18	16,5÷31,5	10,5÷43
Vg	69,28	39,32	0,23	2,14	5,55	-0,11
Vph	74,53	44,76	0,30	2,23	6,01	1,24
CVG,%	7,86	8,57	3,99	10,60	7,53	-
CVF,%	8,15	9,15	4,56	10,80	7,83	4,54
h^2,%	92,96	87,83	76,66	96,28	92,36	-8,67
AG	16,53	12,11	0,86	2,96	4,66	-0,20
AG%	15,60	16,55	7,20	21,43	14,90	-0,81

Notă: Caractere: **TPl -** talia plantei, cm; **LgSP -** lungimea spicului principal, cm; **LgUint -** lungimea ultimului internod, cm.

Coeficientul cel mai înalt de heritabilitate pentru caracterele productivității s-au remarcat pentru *numărul de boabe per spic* (97,61%) la somaclonele SC_1 și *greutatea boabelor* (92,89%) la somaclonele SC_2 (Tabelul 4.11).

Valori mari s-au atestat și pentru indicele *lungimea spicului principal* (96,28%) și *talia plantei* (92,96%). Valorile ridicate ale heritabilității indică, că contribuția genotipului a fost mai mare decât cea a mediului în determinarea fenotipului, fapt atestat și de alți autori [96; 204].

Tabelul 4.11. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 93

Caracter / Parametri	NrB		GB		MMB	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie± ES	48,84±3,32	63,10±2,80	1,44±0,08	2,73±0,15	36,49±0,82	41,77±1,12
Min ÷ max	2÷124	20÷124	0,1÷2,7	0,5÷6,2	14,28÷46,15	20,83÷82,6
Vg	**644,95**	179,30	0,12	0,69	11,20	33,77
Vph	**660,76**	197,92	0,14	0,75	12,91	36,23
CVG,%	52,00	21,22	24,15	30,58	9,17	13,83
CVF,%	52,63	22,29	25,82	31,73	9,85	14,41
h^2,%	**97,61**	90,59	87,44	**92,89**	86,77	92,10
AG	51,69	26,25	0,67	1,65	6,42	11,42
AG%	**105,83**	41,60	46,51	60,72	17,60	27,34

Notă: Caractere: **NrB -** numărul de boabe/spic; **GB -** greutatea boabelor, g; **MMB -** masa a 1000 boabe, g.

Studiul realizat la genotipul Ingen 93, evidențiază valori înalte pentru heritabilitate care este însoțit cu un avantaj genetic semnificativ. Pentru caracterul *numărul de boabe per spic* (h^2= 97,61%, AG=105,83%) la somaclonele SC_1 și *greutatea boabelor* (h^2=92,89%, AG=60,72%), *masa a 1000 de boabe* (h^2=92,10%, AG=27,34%) la somaclonele SC_2. Heritabilitatea ridicată a indicilor: *numărul de boabe per spic*, *greutatea boabelor* și *masa a 1000 de boabe*, împreună cu

un avans genetic majorat, atestă faptul că efectele genelor aditive au fost importante în determinarea acestor caractere, pentru care trebuie să li se acorde prioritate maximă în timpul selecției în ameliorarea triticalelor, fapt demonstrat și la grâu [96].

Valorile cele mai mici ale avantajului genetic asociat cu coeficientul de heritabilitate, s-a atestat pentru *lungimea spicului principal* (h^2=76,66%, AG=7,20%) la somalonele SC_1.Valorile înalte ale heritabilității cuplate cu un avans genetic scăzut indică, că dominanţa şi/sau efectele genelor epistatice joacă un rol mai important asupra eredității caracterului studiat [58].

Genotipul 188TR 5021 s-a remarcat prin valorile parametrilor genetici luați în studiu, care s-au deosebit esențial de celelalte genotipuri.

Valorile coeficientului de variație genotipică și fenotipică pentru somaclonele SC_1 au fost mai mari pentru toate caracterele luate în studiu în comparație cu valorile somaclonelor SC_2, iar diferențele dintre valorile coeficientului de variație genotipică (CVG) și a coeficientului de variație fenotipică (CVF) pentru genotipul 188TR 5021 sunt mici, demonstrând că variația este dependentă de genotip.

Pentru caracterele ce țin de arhitectura plantei valorile coeficientului de variație genotipică și fenotipică au fost mici și medii la *talia plantei* și *lungimea ultimului internod* (Tabelul 4.12).

Tabelul 4.12. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a unor caractere la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul 188TR 5021

Caracter / Parametri	TPl		LgSP		LgUint	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie± ES	95,87±2,05	75,76±1,64	13,34±0,24	14,17±0,26	34,06±0,89	27,19±0,93
Min ÷ max	50,5÷124	40÷115,5	8,5÷19	10÷19	19÷50,5	11,5÷49,5
Vg	295,20	**36,42**	2,54	2,17	44,73	24,28
Vph	299,80	43,47	2,65	2,29	45,90	26,23
CVG,%	17,92	7,97	11,94	10,32	19,64	18,12
CVF,%	18,06	8,70	12,19	10,67	19,89	18,84
h^2,%	**98,46**	83,78	95,97	93,57	97,44	92,56
AG	35,12	11,38	3,22	2,91	13,60	9,77
AG%	36,63	15,02	24,10	20,56	39,93	35,92

Notă: Caractere: **TPl** - talia plantei, cm; **LgSP** - lungimea spicului principal, cm; **LgUint** - lungimea ultimului internod, cm.

Cea mai înaltă valoare a heritabilității s-a estimat la caracterul *talia plantei* (98,46%). Mai mulți cercetători au raportat obținerea heritabilității înalte pentru caracterele: *talia plantei*, *numărul de boabe per spicul principal, lungimea spicului principal* și *greutatea boabelor* și *masa a 1000 de boabe* [252; 328].

Cele mai mari valori ale variației genotipice și fenotipice sunt atestate la somaclonele SC_1 pentru *numărul de boabe per spic* (Vg=727,49; Vph=742,47). La somaclonele SC_2 s-a evidențiat, că variabilitatea fenotipică este mai mare decât variabilitatea genotipică de 2,78 ori, ceea ce reflectă influența mediului asupra acestui caracter. Cele mai mici valori ale variației genotipice și fenotipice s-au înregistrat pentru *greutatea boabelor* în ambele generații (Vg=0,28-1,47; Vph=0,34-1,50) (Tabelul 4.13).

Cele mai majore valori ale CVG și CVF s-au înregistrat pentru caracterele productivității: *greutatea boabelor* (CVG=70,47%; CVF=71,29%) la somaclonele SC_1, valorile cele mai mari s-au remarcat la același caracter și pentru somaclonele SC_2 (CVG=21,70%; CVF=24,01%) fiind mai mic de 2,96 - 3,24 ori. Nivel înalt ale CVG și CVF s-au atestat și pentru *numărul boabelor per spic* (CVG=55,39%; CVF=55,96%) la somaclonele SC_1, iar pentru generația SC_2, valoarea parametrilor a scăzut, CVG de 9,61 ori, CVF de 5,82 ori (Tabelul 4.13).

Tabelul 4.13. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor de productivitate la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul 188TR 5021

Caracter / Parametri	NrB		GB		MMB	
	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2	SC_1	SC_2
Valoarea medie± ES	48,69±3,39	69,76±3,12	1,72±0,16	2,44±0,15	26,25±1,25	33,28±0,99
Min ÷ max	0÷123	13÷133	0÷5,6	0,3÷5,6	0÷41,46	15,55÷52,32
Vg	727,49	16,15	1,47	0,28	26,15	27,62
Vph	742,47	44,95	1,50	0,34	30,15	29,85
CVG,%	55,39	5,76	70,47	21,70	19,48	15,79
CVF,%	55,96	9,61	71,29	24,01	20,92	16,42
h^2,%	97,98	**35,92**	**97,71**	81,62	86,72	92,53
AG	55,00	4,96	2,47	0,99	9,81	10,42
AG%	112,95	**7,11**	**143,49**	40,38	37,37	31,29

Notă: Caractere: **NrB** - numărul de boabe/spic; **GB** - greutatea boabelor, g; **MMB** - masa a 1000 boabe, g.

Analizând rezultatele prezentate, se constată că valorile coeficientului de heritabilitate în sens larg sunt mari pentru ambele generații, indicând contribuţia ridicată a genotipului pentru caracterele: *greutatea boabelor* (97,71%) și *numărul de boabe* (97,98%).

Asocierea coeficientului de heritabilitate și a avantajului genetic cu valori foarte înalte (h^2=97,71%, AG=143,49%) pentru *greutatea boabelor* și *numărul de boabe per spic* (h^2=97,98%, AG=112,95%) la somaclonele SC_1, relevă contribuția pronunțată a variației genetice aditive în controlul acestor caractere, ceea ce prezintă o oportunitate sporită în selecția eficientă a genotipului după fenotip. Pentru somaclonele SC_2 valorile heritabilității s-au menținut înalte, dar în comparație cu SC_1 au scăzut de 1,19 ori, iar pentru avantajul genetic de 3,55 ori la caracterul *greutatea boabelor* (Tabelul 4.13).

Ranoliya P. [274] a stabilit, că caracterele: talia plantei, numărul de boabe per spicul principal, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe la grâu cu heritabilitatea ridicată s-au combinat cu un avantaj genetic mare, fapt demonstrat și în cercetările noastre.

Heritabilitate moderată (35,92%) și cu un avans genetic scăzut (7,11%) a fost evidențiată la caracterul: *numărul de boabe per spic principal* la generația SC_2. Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele obținute la orez pentru caracterele ce ține de productivitate [90], care indică, că de rând cu genotipul acţionează probabil şi alți factori, cum ar fi cele datorate interacţiunilor cu mediul, care influenţează manifestarea caracterului studiat.

Contribuția genotipului, mediului și a interacțiunii genotip x mediu este variabilă în exprimarea fenotipică a caracterelor cantitative. Variante genotipice și fenotipice majore sunt atestate pentru caracterele: *talia plantei, lungimea ultimului internod, numărul de boabe* și *masa a 1000 de boabe*. Valorile cele mai mari s-au remarcat pentru somaclonele SC_1 la genotipul 188TR 5021 (Vg=727,49; Vph=742,47) pentru indicele *numărul de boabe per spic* și *talia plantei* (Vg=295,20; Vph=299,80), iar valori mici au fost înregistate la somaclonele SC_1 (Ingen 35) pentru *greutatea boabelor* (Vg=0,06; Vph=0,08) și *lungimea spicului principal* (Vg=0,57; Vph=0,64).

Coeficientul de variație fenotipică a fost mai mare decât coeficientul de variație genotipică pentru toate caracterele luate în studiu, ceea ce indică că variația nu a fost influențată semnificativ de condițiile de mediu, dar este dependentă prioritar de genotip. Cele mai mari valori CVG și CVF au fost înregistrate pentru caracterele de productivitate a somaclonelor SC_1: *greutatea boabelor* (CVG=70,47%; CVF=71,29%) și *numărul de boabe per spic* (CVG=55,39%; CVF=55,96%) pentru genotipul 188TR 5021. Valori mari s-au atestat și pentru genotipul Ingen 93 la aceleași caractere precum *numărul de boabe per spic* (CVG=52,00%; CVF=52,63%) și *greutatea boabelor* (CVG=30,58%; CVF=31,73%). Valori minime s-au estimat pentru *lungimea spicului principal* (CVG=3,99%; CVF=4,56%) la somaclonele SC_1 a genotipului Ingen 93.

Cel mai înalt coeficient de heritabilitate a fost stabilit la somaclonele SC_1 pentru indicii: *talia plantei* (98,46%) și *numărul de boabe per spic* (97,98%) pentru genotipul 188TR 5021. Genotipul Ingen 93 a înregistrat valori mari la caracterele: *numărul de boabe per spic* (97,61%) și *lungimea spicului principal* (96,28%).

Coeficientul de heritabilitate înalt asociat cu contribuția avantajului genetic sporit se atestă pentru *greutatea boabelor* (h^2=97,71%, AG=143,49%) și *numărul de boabe per spic* (h^2=97,98%, AG=112,95%) la somaclonele SC_1 (188TR 5021) și la aceeași caractere la Ingen 93

pentru *numărul de boabe per spic* (h^2= 97,61%, AG=105,83%) și respectiv *greutatea boabelor* (h^2=92,89%, AG=60,72%).

Heritabilitatea ridicată a indicilor: *talia plantei, numărul de boabe per spic, greutatea boabelor* și *masa a 1000 de boabe*, împreună cu un avans genetic majorat denotă efectele aditive în determinarea acestor caractere.

Studiul realizat pune în evidență existența unei variabilități genetice semnificative între genotipurile de triticale. Analizând valorile caracterelor cantitative s-a evidenţiat o variabilitate înaltă pentru caracterele ce țin de productivitatea plantei: *talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe per spic, greutatea boabelor* și *masa a 1000 de boabe* ceea ce permite selectarea şi recomandarea celor mai valoroase somaclone pentru evidențierea genotipurilor și obţinerea soiurilor noi cu diferită destinaţie.

Concluzii la capitolul 4

1. Impactul acțiunii culturii *in vitro* separat și în comun cu radiația gama în calitate de modificatori genetici, prezintă variații în manifestarea unor caractere cantitative la somaclonele de triticale, fiind stabilite particularitățile specifice fiecărui genotip.
2. Evaluarea parametrilor morfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale: *talia plantei, lungimea spicului principal și ultimului internod, numărul fraților fertili și internodurilor per plantă, numărul boabelor per spic, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe*, atestată variație semnificativă a valorilor medii la nivel de 95 - 99,9%, în comparație cu martorul în dependență de genotip, factorii luați în studiu (raze gama și cultura *in vitro*) și indicele biomorfologic.
3. Cultura *in vitro* asociată cu mutageneza experimentală reprezintă o sursă semnificativă, confirmată în baza analizei variației, puterea de influență a cărora depinde de particularitățile genotipului. Acest lucru demonstrează impactul culturii *in vitro* și a radiației gama, ca stimulatori și inductori ai diversităţii şi variabilităţii genotipice la plante.
4. Rezultatele obținute evidențiază somaclonele SC_2 a genotipului Ingen 93 *(in vitro)* și 188TR 5021 (RAD), pentru care toate caracterele cantitative au prezentat valori mai mari decât martorul, semnificative (95 - 99,9%), determinative fiind 5 însușiri biomorfologice: *talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe.* Rezultatele confirmă eficacitatea factorilor cercetați în extinderea variabilității genetice la triticale, date ce argumentează raționamentul utilizării somaclonelor în următoarele generații în vederea selectării genotipurilor cu caractere performante.

5. Evaluarea variabilității molecular-genetice prin analiza RAPD-PCR a scos în evidență la somaclonele de triticale prezența unui polimorfism înalt, ceea ce indică un potențial mai mare de ameliorare al formelor hexaploide incluse în cercetare.

6. Generalizând rezultatele genotipării cu primerii arbitrari RAPD, s-au evidențiat 9 primeri: OPD07, OPH15, OPG06, OPG10, OPB12, OPC07, OPI16, OPB14 și OPC05, care în conformitate cu toți parametrii analizați (număr ampliconi total/6-16, polimorfi/ 1-9, PIC/ 0,17-0,49), sunt cei mai informativi în discriminarea formelor de triticale analizate și se recomandă în scopul studierii variabilității genetice ca suport de referință în ameliorare.

7. Analiza clusteriană în baza dendrogramei a determinat delimitarea genotipurilor de triticale și formelor acestora în două clustere principale, cu excepția formei Ingen 93 *in vitro*, care înregistrează cel mai mare indice de distanță genetică (0,26), fapt ce confirmă diversitatea accentuată în profilul genetic al acesteia și prezența fragmentelor specifice, fiind un indicator de performanță și superioritate a somaclonelor obținute.

8. Aprecierea variației și a parametrilor genetici a unor caractere cantitative determină condițiile cele mai optime pentru evidențierea caracterelor prețioase pentru ameliorarea triticalelor. Analiza variației a evidențiat o contribuție semnificativă (la nivel de 95 - 99,9%) asupra indicilor biomorfologici condiționată de generațiile SC_1 și SC_2.

9. Estimarea coeficientului heritabilității în procesul de ameliorare a triticalelor, permite de a prognoza eficient și veridic selectarea celor mai valoroase somaclone. Mărimea coeficientului de heritabilitate a variat în dependență de caracter, genotip și generația studiată, înregistrând cea mai înaltă valoare (98,46%) la talia plantei, pentru somaclonele SC_1 (188TR 5021), ceea ce denotă o influență mai mare a genotipului în manifestarea caracterului dat. Coeficientul de heritabilitate înalt asociat cu contribuția avantajului genetic sporit se atestă pentru *greutatea boabelor* și *numărul de boabe per spic*, ceea ce confirmă faptul că efectele aditive au fost importante în determinarea acestor caractere.

10. Indicii ce țin de productivitatea plantei: *talia plantei, numărul de boabe per spic, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe* pot fi utilizaţi ca reper relevant în evaluarea diversității somaclonale generate de radiația gama și cultura *in vitro*, deci ar trebui să li se acorde prioritate maximă în procesul selecției în ameliorarea triticalelor.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

Concluzii generale

1. Studiile complexe biotehnologice, genetice și moleculare ale calusogenezei, morfogenezei și regenerării au scos în evidență impactul separat și asociat al culturii *in vitro* și razelor gama în sporirea variabilității genetice la triticale.

2. Interacțiunea factorilor „vârsta explantului" – „genotip" denotă o influenţă semnificativă în stabilirea unui răspuns pozitiv la condițiile de cultivare *in vitro*. S-a atestat, că frecvența calusogenezei este determinată de vârsta explantului (70,64%) și genotip (6,68%). Rezultatele analizei comparative ale capacității calusogenezei pentru explantele analizate au evidențiat, că utilizarea embrionilor maturi de triticale este o sistemă mai eficientă decât utilizarea fragmentelor foliare (cap. 3, [4; 10]).

3. Investigațiile citologice ale celulelor calusale au stabilit dependența de genotip și fundalul experimental a activități mitotice și ratei mutațiilor în anafază-telofază, exprimate prin sporirea aberațiilor de tipul: celule binucleate, aranjare ciclică a cromozomilor, formarea fragmentelor cromozomiale ce condiționează instabilitatea mitozei, care pot fi transmise regeneranților (cap. 3, [8]).

4. S-au stabilit dozele cu efect stimulator și inhibitor asupra embrionilor maturi de triticale a razelor gama în diapazonul 50-250 Gy. Radiația gama în limitele 50-150 Gy a avut un efect stimulator asupra frecvenței calusogenezei, morfogenezei și regenerării în comparație cu martorul, înregistrând diferențe semnificative la nivel de 95 - 99,9%, iar expunerea la dozele de 200-250 Gy au prezentat efect inhibitor asupra creșterii calusului și formării zonelor morfogene, pe parcursul subcultivării calusul necotizându-se (cap. 3, [3]).

5. Rolul genotipului, dozei de radiație cât și interacțiunea genotip - radiație asupra morfogenezei și regenerării de lăstari au fost semnificative ($P \leq 0,05; 0,001$), puterea de influență majoră fiind atribuită genotipului (49,35%) (cap. 3, [9]).

6. Somaclonele SC_0 derivate din cultura de embrioni maturi supuși iradierii gama au prezentat diferite trăsături morfofiziologice (*talia plantei, lungimea spicului principal* și *numărul de boabe per spic*), frecvența și spectrul de variație al cărora au fost specifice fiecărui genotip luat în studiu (cap. 3, [5]).

7. Evaluarea parametrilor morfologici la somaclonele SC_1 - SC_2 de triticale: *talia plantei, lungimea spicului principal* și *ultimului internod, numărul fraților fertili* și *internodurilor per plantă, numărul boabelor per spic, greutatea boabelor* și *masa a 1000 de boabe*, atestă variații semnificative ale valorilor medii la nivel de 95 - 99,9%, față de martor în dependență de genotip, factorii luați în studiu (raze gama și cultura *in vitro*) și indicele biomorfologic (cap. 4, [80]).

8. Analiza varianței caracterelor cantitative a demonstrat impactul culturii *in vitro* suplimentat de razele gama în sporirea variabilității la somaclonele SC_2, cele mai expresive devieri fiind înregistrate pentru *talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe, greutatea boabelor* și *masa a 1000 boabe,* ceea ce justifică eficiența utilizării somaclonelor în vederea selectării genotipurilor cu caractere performante (cap. 4).

9. Evaluarea variabilității molecular-genetice prin analiza RAPD-PCR a determinat un polimorfism înalt la somaclonele de triticale. În baza numărului de ampliconi polimorfi, conținutului informației polimorfe au fost evidențiați 9 primeri: OPD07, OPH15, OPG06, OPG10, OPB12, OPC07, OPI16, OPB14 și OPC05, informativi în discriminarea formelor de triticale analizate și evidențierea regeneranților cu diversitate accentuată în profilul genetic al somaclonelor obținute (cap. 4, [81]).

10. Aprecierea varianței și a parametrilor genetici a caracterelor cantitative la somaclonele SC_1 - SC_2 a relevat variația valorii coeficientului de heritabilitate în dependență de caracter, genotip și generație, evidențiind genotipurile cu avantaj genetic sporit pentru parametri importanți asociați productivității, precum *greutatea boabelor, numărul de boabe per spic*, ceea ce confirmă eficiența obținerii genotipurilor valoroase și perspectiva utilizării lor în ameliorarea triticalelor (cap. 4).

Recomandări practice

1. În rezultatul cercetărilor complexe biotehnologice, genetice a fost optimizat procedeul de inducere a variabilității somaclonale la triticale, repere ce pot fi recomandate pentru utilizare practică:

- folosirea în calitate de explante a embrionilor maturi, care sunt ușor de depozitat și disponibili pe termen lung;
- iradierea semințelor de triticale cu raze gama în dozele 50-150 Gy pentru sporirea variabilității somaclonale, având la bază efectele mutaționale cu potențial de transmitere ereditară.

2. Folosirea primerilor RAPD (OPD07, OPH15, OPG06, OPG10, OPB12, OPC07, OPI16, OPB14 și OPC05), în scopul aprecierii variabilității genetice ca suport de referință în selectarea genotipurilor de triticale.

3. Utilizarea în programele de ameliorare și conservare a germoplasmei vegetale a somaclonelor evidențiate prin caractere de interes ce au prezentat valori înalte ale heritabilității asociate cu un avantaj genetic majorat, ce denotă eficiența utilizării genotipurilor selectate în ameliorarea triticalelor (somaclonele SC_2 - SC_3 ale genotipurilor Ingen 93 (*in vitro* și raze gama) și 188 TR 5021 (raze gama)).

BIBLIOGRAFIE

Surse în limba română

1. ANDRONIC, L. *Bazele citogenetice ale variabilității genetice la plantele de cultura în condiții de patogeneză virală*. Chişinău: Print - Caro, 2020, 236 p., ISBN 978-9975-56-762-6.
2. CACHIŢĂ - COSMA, D. *Tratat de biotehnologie vegetală*. Cluj-Napoca: Dacia, 2004, vol. 1. 433 p. ISBN 973-35-1798-4.
3. **CIOBANU, R.** Acţiunea razelor gama asupra masei calusale şi regenerării de plantule în cultura *in vitro* la triticale. In: *Agronomie şi agroecologie*. Chişinău, 2018, vol. 52(1), pp. 358-363. ISBN 978-9975-64-301-6.
   https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/89523
4. **CIOBANU, R.** Aprecierea potențialului morfogenetic și regenerativ al genotipurilor de triticale în cultura *in vitro*. In: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor:* conferința șt. intern., Ed. VII, 4-5 oct. 2021. Chişinău, 2021, pp. 127-130. ISBN 978-9975-56-912-5. DOI: 10.53040/gppb7.2021.33.
   https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/139649
5. **CIOBANU, R.** Aspectul morfologic al regeneranţilor de triticale obţinuţi *in vitro* sub acţiunea radiaţiei gama. In: *Ştiinţele vieţii în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri*: conferința șt.naț. cu participare intern., 21-22 oct. 2019. Chişinău, 2019, pp. 21-22. ISBN 978-9975-108-83-6.
   https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/89465
6. **CIOBANU, R.** Cercetări privind influența genotipului și a mediului de cultură asupra procesului de calusogeneză la triticale In: *Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei şi ameliorării*: conferința naţ. (jubiliară) cu participare intern., 17-18 febr. 2005. Chișinău, 2005, pp. 149-152. ISBN 9975-64-034-6.
7. **CIOBANU, R.** Inducerea calusogenezeişi regenerării plantulelor din embrionii maturi la diferite genotipuri de triticale. In: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor:* conferința șt. Intern., Ed. V, 23-24 oct. 2014. Chişinău, 2014, pp. 189-193. ISBN 978-9975-56-912-5.
   https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/108212
8. **CIOBANU, R.**, SÎROMEATNICOV, I., COTENCO, E. Influența culturii *in vitro* asupra indicilor citogenetici la triticale. In: *Realizări științifice in ameliorare și tehnologii inovative la culturile cerealiere în contextul schimbărilor climaterice:* conferința șt. - pract. cu participare intern., 4-5 sept. 2020, Pașcani. Chişinău, 2020, pp. 170-175. ISBN 978-9975-56-177-8.
   https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/113204
9. **CIOBANU, R.** Influenţa genotipului şi a razelor gama asupra regenerării de plantule în cultura *in vitro* la triticale. In: *Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice:* conferința șt. cu participare intern., Ed. II, 23 noiem. 2018. Chișinău, 2018, pp. 164-170. ISBN 978-9975-3178-9-4.
   https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/71118
10. **CIOBANU, R.** Influenta interactiunii factorilor „Genotip” – „Vârsta explantului” asupra frecventei calusogenezei la triticale. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective:* simpozion șt. naţ. cu participare intern., Ed. III, 24-25 oct. 2013. Chişinău, 2013, p. 16. ISBN 978-9975-159-81-4.
    https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/98406
11. **CIOBANU, R.** Studiul frecvenței calusogenezei la triticale în dependență de mediul de cultură și genotip. In: *Genetica şi ameliorarea plantelor, animalelor şi*

microorganismelor: congresul 8 al Societăţii Geneticienilor şi Amelioratorilor din Rep. Moldova, 29-30 sept. 2005. Chișinău, 2005, pp.468-473. ISBN 9975-78-427-5.
12. DOROŞ, I., Mas - metodă eficientă în studierea diversităţii genetice intraspecifice. In: *Viitorul ne aparţine*: conferința - manifestare șt. intern., Chișinău, Moldova, 29 apr. 2015. Ed. a 5-a. Chișinău, 2015, p. 16. ISBN978-9975-3036-5-1.
13. DUCA, M., GLIJIN, A., ACCIU, A., GÎSCA, I. Markerilor RAPD în screening-ul molecular al rezistenţei florii - soarelui la lupoaie. In: *Agronomie şi ecologie*, 9-11 oct. 2013, Chişinău, 2013, vol. 39, pp. 168-172. ISBN 978-9975-64-250-7.
14. DUCA, M., CLAPCO, S., MARTEA, R. Diverse aspecte de aplicare a metodei RAPD-PCR în studiul plantelor. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*, 2019, nr. 2(338), pp. 8-16. ISSN 1857-064X.
15. GRIGOROV, T., SMEREA, S., ANDRONIC, L. Variabilitatea caracterelor agromorfologice la somaclonele de orz (SC_0) indusă de radiație gama și infecție virală. In: *Realizări ştiinţifice in ameliorare şi tehnologii inovative la culturile cerealiere în contextul schimbărilor climaterice:* conferința șt.- pract. cu participare intern., 4-5 sept. 2020. Chișinău, 2020, pp. 153-161. ISBN 978-9975-56-177-8.
16. GRIGOROV, T., SMEREA, S., ANDRONIC, L., BERZOI, V. Variabilitatea caracterelor cantitative la orz în generaţiile M_0 - M_3 la plantele supuse acţiuniiinfecţiei virale. In: *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţele vieţii*. 2013, nr 3(321), pp. 83-89. ISSN 1857-064X.
17. ION, V. *Fitotehnie: curs universitar*. Bucureşti, 2010.
18. ITTU, Gh., SĂULESCU, N.N., ITTU, M., MUSTĂŢEA, P. Realizări şi perspective în ameliorarea speciei triticale în România. In: *Lucrări ştiinţifice ale Universitaţii de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară*. Bucureşti, 2005, vol. 45, p. 74. ISSN 1222-5304
19. LUPAŞCU, G., GAVZER, S. Variabilitatea şi heritabilitatea vigorii boabelor de grâu comun la interacţiunea cu Drechslera Sorokiniana. In: *Protecţia plantelor - realizări şi perspective*: conferința șt., 27-28 oct. 2020. Ed. a 57-a. Chișinău, 2020, pp. 277-282. ISBN 978-9975-3472-0-4. DOI: 10.53040/9789975347204.68.
20. MURARIU, D., CRISTEA, M. *Diversitatea genetică și eroziunea genetică a resurselor genetice vegetale*. Iași: Editura PIM, 2019. ISBN 978-606-13-5302-6.
21. PALII, A. Studiul şi utilizarea variabilităţii genetice în ameliorarea calităţii bobului la specia *Zea mays* L. In: *Akademos: Revista de ştiinţă, inovare, cultură şi artă*. 2008, nr 4(11), pp. 66-71. ISSN 1857-0461.
22. SAŞCO, E. Reacţia embrionilor maturi de *Triticum aestivum* la filtratele de cultură *Fusarium* sp. In: *Studia universitatis Moldaviae. Ser. Ştiinţe reale şi ale naturii*. 2010, nr 1(31), pp. 40-46. ISSN 1814-3237.
23. SMEREA, S., ANDRONIC, L. Studiul variantei genotipice și fenotipice a caracterelor de productivitate la descendenții dubluhaploizilor de orz de primăvară. In: *Ştiinţa în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective: confrința șt.*, Bălți, 21-22 iunie 2019. Ed. a 3-a. Balti, 2019, pp. 194-198. ISBN 978-9975-3316-1-6.
24. TUDOSE, S. V. *Cercetări ecologic asupra culturilor de triticosecale înfiinţate pe solurile podzolice de la Albota-Argeş*: teză. de doctorat. Piteşti, 2010, 182 p. Disponibil: http://www.samanatorul.ro/editura/2010/Vasilichia_Tudose_Sinescu-Culturi_de_tritico secale.pdf.
25. VEVERIŢĂ, E., BUIUCLI, P. Rolul materialului iniţial în procesul de creare a formelor noi de triticale hexaploide secundare. In: *Agricultura Moldovei*. 2008, nr 5-6, pp. 23-26. ISSN 0582-5229.
26. VEVERIŢĂ, E., LEATAMBORG, S. Triticale – cultură profitabilă pentru agricultura Moldovei. In: *Aspecte innovative în ameliorarea culturilor agricole* : materialele conf.

intern., Paşcani, Moldova, 6-7 sept. 2018. Paşcani, 2018, pp. 325-333. ISBN 978-9975-111-161-1; ISBN 978-9975-56-560-8.

surse în limbi străine

27. ABDELNOUR-ESQUIVEL, A., PEREZ, J., ROJAS, M., VARGAS, W., GATICA-ARIAS, A. Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2020, vol. 56, pp. 88-97. ISSN 1054-5476 (print). DOI:10.1007/s11627-019-10015-5.
28. ABREU, I., CARVALHO, C., CLARINDO, W. Massal induction of *Carica papaya* L. ”golden” somatic embryos and somaclone screening by flow cytometry and cytogenetic analysis. In: *Cytologia*. 2014, vol. 79, pp. 475-484. ISSN 1348-7019.
29. ADLY, W.M.R.M., NIEDBAŁA, G., EL-DENARY, M., MOHAMED, M., PIEKUTOWSKA, M., WOJCIECHOWSKI, T., ABD EL-SALAM, E., FOUAD, A. Somaclonal variation for genetic improvement of starch accumulation in potato (*Solanum tuberosum)* Tubers. In: *Plant*s. 2023, vol. 12, p. 232. ISSN 2223-7747 https://doi.org/10.3390/ plants12020232.
30. AGUADO-SANTACRUZ, G., VELAZQUEZ-ORDINOLA, A., MORENOGOMEZ, B., GOMEZ-TORRES, L., DIAZ-ESPINO, L., VAZQUEZ, F. Development of long - term and reliable *in vitro* plant regeneration systems for elite malting barley varieties: Optimizing media formulation and explant selection. In: *African Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 10, pp. 19522-19533. ISSN 1684-5315. DOI:10.5897/AJB11.1736.
31. AGUIAR-PERECIN, L., SANTOS-SEREJO, M., GARDINGO, J. et al. Maize chromosome abnormalities and breakage – fusion - bridge cycles in callus cultures. In: *Chromosomal Abnormalities*. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.88876. Disponibil: https://www.researchgate.net/publication/337700883_Maize_Chromosome_Abnormalities_and_Breakage-Fusion-Bridge_Cycles_in_Callus_Cultures.
32. AHMAD, A., TAHIR, U., QAMAR, M., SHOUKAT, A., ASLAM, M., TARIQ, M., HAKIMAN, M., JOYIA, F. The effects of genotypes and media composition on callogenesis, regeneration and cell suspension culture of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). In: *Peer J*. 2021, 9:e11464. ISSN 2167-8359. http://doi.org/ 10.7717/peerj.11464.
33. AHUMADA-FLORES, S., GÓMEZ PANDO, L., PARRA COTA, F., SARSU, F., DE LOS SANTOS VILLALOBOS, S. Technical note: gamma irradiation induces changes of phenotypicand agronomic traits in wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum). In: *Applied Radiation and Isotopes*. 2021, vol. 167, 109490. ISSN 0969-8043. DOI: 10.1016/j.apradiso.2020.109490.
34. AKHTAR, S., NIAZ, M., UR-RAHMAN, S., YOUNAS, M., IQBAL, M. Somaclonal variation for development of salt tolerance in selected wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. In: *International journal of agriculture & Biology*. 2012, vol. 14, pp.176-180. ISSN 1560-8530 (print), ISSN 1814-9596 (online).
35. AL-SAFADI, B., AYYOUBI, Z., JAWDAT, D. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000, vol. 61, pp. 183-187. ISSN 1573-5044 (online).
36. ALI, A., EL-DENARY, M., EL-GENDY, A., GALAL, O., MOHAMED, M., EL SAYED, T. Morphological evaluation of some tomato somaclones variation under field conditions. In: *Journal of Plant Production Science*. 2018, vol. 9(10), pp. 833-838. ISSN 1349-1008 (online). DOI:10.21608/JPP.2018.36443.

37. ALI, M., RAJEWSKI, J., BAENZIGER, P., GILL, K., ESKRIDGE, K., DWEIKAT, I. Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. In: *Molecular Breeding*. 2008, vol. 21(4), pp. 497-509. ISSN 1380-3743.
38. ALVAREZ, A., FUENTES, J., PULDON, V. et al. Genetic diversity analysis of Cuban traditional rice (*Oryza sativa* L.) varieties based on microsatellite markers. In: *Genetics and Molecular Biology*. 2007, vol. 30(4), pp. 1109-1117. ISSN 1678-4685 (online).
39. ANDERSON, J. et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. In: *Genome*. 1993, vol. 36(1), pp. 181-186. ISSN 1480-3321 (online).
40. ANDREW – PETER-LEON, M., RAMCHANDER, S., KUMAR, K., MUTHAMILARASAN, M., PILLAI, M. Assessment of efficacy of mutagenesis of gamma irradiation in plant height and days to maturity through expression analysis in rice. In: *PLOS ONE*. 2021, vol. 16, e0245603. ISSN 1932-6203 (online).
41. ÁNGELES, E., VALENCIA, B., VIRGEN, C., RAMÍREZ, S., PAREDES, G., HURTADO-De la PEÑA, S. Determinación de la dosis letal (dl50) con CO60 *en vitro* plántulas de Agave Tequilana Var. Azul. In: *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2013, vol. 36, p. 381. ISSN 0187-7380.
42. ARRIN, R., KHUMAIDA, N., SUKMA, D. Effect of gamma irradiation on callus of handeuleum (*Graptophillum pictum* L. Griff) kalimantan and papua accession. In: *Jurnal Hortikultura Indonesia*. 2022, vol. 13(1), pp. 23-28. ISSN 2087-4855 (print).
43. ARSENIUK, E. Recent Developments in triticale breeding research and production – an Overview ekin. In: *Journal of Crop Breeding and Genetics*. 2019, vol. 5(2), pp. 68-73. ISSN 2459-069X (online).
44. ARSENIUK, E. Triticale abiotic stresses – an overview. In: *Triticale*. Editor: F. EUDES. Verlag: Springer International Publishing, 2015a, part 2, pp. 69-82. ISBN 978-3-319-22550-0.
45. ARSENIUK, E., GORAL, T. Triticale biotic stresses – known and novel foes. In: *Triticale*. Editors: F. EUDES. Berlin: Springer, 2015b, chapter 5, pp. 83-108. DOI:10.1007/978-3-319-22551-7_5.
46. ARSENIUK, E. Triticale diseases – a review. In: *Triticale: today and tomorrow*. Editor: H. GUEDES-PINTO, N. DARVEY, V.P. CARNIDE. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, pp. 499-525. ISBN 978-0792342120. Disponibil:https://www.researchgate.net/publication/279410146_Triticale_Diseases_-_a_Review.
47. ARUN, B., SINGH, B., SHARMA, S., PALIWAL, R., JOSHI, A. Development of somaclonal variants of wheat (*Triticum aestivum* L.) for yield traits and disease resistance suitable for heat stressed and zero – till conditions. In: *Field Crops Research*. 2007, vol. 103, pp. 62-69. ISSN 1872-6852 (online).
48. ARUN, B., JOSHI, A., CHAND, R., SINGH, B. Wheat somaclonal variants showing earliness, improved spot blotch resistance and higher yield. In: *Euphytica*. 2003, vol. 132, pp. 235-241. ISSN 0014-2336 (print).
49. ARNHOLD-SCHMITT, B. Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). In: *Theor. Appl. Genet.* 1993, vol. 85, pp. 793–800.
50. AWAN, M., IQBAL, M., SHARIF, M. Evaluation of genotypic and hormone mediated callus induction and regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In: *Int. J. Bot. Stud.*, 2019, vol. 4, pp. 70–76. ISSN 2455-541X (Online). DOI:https://www.re searchgate.net /publication/337622294
51. AYDIN, M., ARSLAN, E., TASPINAR, M., KARADAYI, G., AGAR, G. Analyses of somaclonal variation in endosperm - supported mature embryo culture of rye (*Secale*

cereal L.). In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2016, vol. 30(6), pp. 1082-1089. ISSN 1314-3530 (online).
https://doi.org/10.1080/13102818.2016.12249 80.
52. AYDIN, M., TASPINAR, M., ARSLAN, E., SIGMAZ, B., AGAR, G. Auxin effects on somaclonal variation and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Pakistan Journal of Botany*. 2015, vol. 47(5), pp. 1749-1757. ISSN 2070-3368(online).
53. BADO, S., FORSTER, B., NIELEN, S., ALI, A., LAGODA, P., TILL, B. and LAIMER, M. Plant mutation breeding: current progress and future assessment. In: *Plant Breeding Reviews*. 2015, vol. 39, pp. 23-88. ISSN 0730-2207.
54. BAER, G., YEMETS, A., STADNICHUK, N., RAKHMETOV, D. and BLUME, Y. Somaclonal variability as a source for creation of new varieties of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.). In: *Cytology and Genetics*. 2007, vol. 41(4), pp. 204-208. ISSN 0095-4527.
55. BAIRU, M., AREMU, A. and STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. In: *Plant Growth Regulation*. 2011, vol. 63(2), pp. 147-173. ISSN15735087, 01676903.
DOI.org/10.1007/s10725-010-9554-x.
56. BAIRU, M., FENNELL, C., VAN STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). In: *Scientia Horticulturae*. 2006, vol. 108, pp. 347-351. ISSN 0304-4238.
DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.039.
57. BALZARINI, M., TEICH, I., BRUNO, C. Making genetic biodiversity measurable: A review of statistical multivariate methods to study variability at gene level. In: *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 2011, vol. 43(1), pp. 261-275. ISSN 1853-8665 (electrónico).
58. BASCIFTCI, Z., KINACI, G., KINACI, E. Genetic variability and heritability association with spike yield and related characters in durum wheat (*Triticum durum* (L.) Desf.). In: *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2013, vol. 11(3/4), pp. 781-784. ISSN1459-0263 (online).
59. BASKARAN, P., KUMARI, A., NAIDOO, D., VAN STADEN, J. *In vitro* propagation and ultrastructural studies of somatic embryogenesis of *Ledebouria ovatifolia*. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2016, vol. 52, pp. 283-292. ISSN 1475-2689 (online).
60. BEDNAREK, P., PACHOTA, K., DYNKOWSKA, W., MACHCZYŃSKA, J., ORŁOWSKA, R. Understanding *in vitro* tissue culture - induced variation phenomenon in microspore system. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, Jul 14, vol. 22(14), 7546. ISSN 1422-0067. Doi: 10.3390/ijms22147546. PMID: 34299165; PMCID: PMC8304781.
61. BEDNAREK, P., ORŁOWSKA, R. Plant tissue culture environment as a switch - key of (epi) genetic changes. In: *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 2019, vol. 140(4), pp. 245-257. ISSN 1573-5044 (online). https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1.
62. BELLO-BELLO, J., IGLESIAS-ANDREU, L., AVILÉS-VIÑAS, S., GÓMEZ-UC, E., CANTO-FLICK, A., SANTANA-BUZZY, N. Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. In: *HortScience*. 2014, vol. 49, pp. 481-485. ISSN 2327-9834 (online).
63. BENDERRADJI, L., BRINI, F., KELLOU, K., YKHLEF, N., DJEKOUN, A., MASMOUDI, K., BOUZERZOUR, H. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. In: *International Scholarly Research Notices. Agronomy*. 2012, vol.6,

pp. 1-8. Article ID 367851 ref.48. Disponibil: https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133105947.
64. BENNETZEN, J. Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions. In: *Plant Cell*. 2000, vol. 12(7), pp. 1021-1029. ISSN 1040-4651 (print).
65. BETEKHTIN, A., ROJEK, M., JASKOWIAK, J., MILEWSKA-HENDEL, A., KWASNIEWSKA, J., KOSTYUKOVA, Y., KURCZYNSKA, E., RUMYANTSEVA, N., HASTEROK, R. Nuclear genome stability in long - term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. In: *PLOS ONE*. 2017, vol. 12(3), e0173537. ISSN 1932-6203 (online). DOI: 10.1371/journal.pone.0173537. PMID: 28278222; PMCID: PMC5344457.
66. BHANDARI, H., BHANU, A., SRIVASTAVA, K. et al. Assessment of genetic diversity in crop plants – an overview. In: *Advances in Plants & Agriculture Research*. 2017, nr 7(3), pp. 279-286. ISSN 2373-6402 (online).
67. BHARDWAJ, S., THAKUR, T., SHARMA, R., SHARMA, P. *In vitro* selection of resistant mutants of ginger (*Zingiber officinale* rosc.) against wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* F. sp. *Zingiber itrujillo*). In: *Plant Disease Research*. 2012, vol. 27, pp. 194-199. ISSN 2249-8788 (online).
68. BIRSIN, M. and OZGEN, M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (x *Triticosecale* Wittmack). In: *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2004, vol. 9, pp. 353-361. ISSN 1425-8153.
69. BLUM, A. The abiotic stress response and adaptation of triticale – a review. In: *Cereal Research Communications*. 2014, vol. 42, pp. 359-375. ISSN 0133-3720. Disponibil: https://doi.org/10.1556/CRC.42.2014.3.1.
70. BOROS, D. Influence of R genome on the nutritional value of triticale for broiler chicks. In: *Animal Feed Science Technology*. 1999, vol. 76, pp. 219-226. ISSN 3778401. Disponibil: https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00226-0.
71. BORZOUEI, A., KAFI, M., KHAZAEI, H. NASERIYAN, B. MAJDABADI, A. Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. In: *Pakistan Journal of Botany*. 2010, vol. 42(4), pp. 2281-2290. ISSN 5563-321, ISSN 2070-3368 (online).
72. BOTSTEIN, D., WHITE, R., SKOLNICK, M., DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. In: *The American Journal of Human Genetics*. 1980, vol. 32(3), pp. 314-331. ISSN 0002-9297.
73. BURG, H., RAMULU, K., BREDEMEIJER, G., ROEST, S., DHIJKUIS, P., HOOGEN, J., HOUWING, A. Patterns of phenotypic and tuber protein variation in plants derived from protoplast of potato (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje). In: *Plant Science*. 1989, vol. 64, pp. 113-124. ISSN: 1873-2259 (online). Disponibil: https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90157.
74. BUSHRA, S., FAISAL, S., FOZIA, S., JAVARIA, A., ABDULLAH B., MUHAMMAD, N., SAMRA, H., FARWA, A. and MARIAM, N. Exploring plant genetic variations with morphometric and molecular markers. In: *Genetic Variation*. Edit.: R.T. MAIA, M.A. CAMPOS. Pakistan, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.95026. ISBN 978-1-83881-097-9. Disponibil: https://cdn.intechopen.com/pdfs/74579.pdf.
75. CAPLIN, N., WILLEY, N. Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. In: *Frontiers in Plant Science*. 2018, vol. 9, p. 847. ISSN 1664-462X.
76. CHANG, Y., VON ZITZEWITZ, J., HAYES, P., CHEN, T. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). In: *Plant Cell Reports*. 2003, vol. 21, pp. 733-738. ISSN 0721-7714 (Print).

77. CHAUDHARY, J., DESHMUK, R., SONAH, R. Mutagenesis approaches and their role in crop improvement. In: *Plants.* 2019, vol. 8(11), p. 467. ISSN 2223-7747. DOI:10.3390/plants8110467.
78. CHEN, J., ZHANG, Y., DUAN, J., CAO, Y., CAI, X. Morphological, cytological, and pigment analysis of leaf color variants regenerated from long - term subcultured caladium callus. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2021, vol. 57, pp. 60-71. ISSN 1054-5476.
79. CHESNOKOV, Y., ARTEMYEVA, A. Evalution of polymorphism information of genetic diversity. In: *Agricultural Biology*. 2015, vol. 50(5), p. 571-578. ISSN 2151-7525.
80. **CIOBANU, R.** Variability of biomorphological and quantitative caracteristics of SC_1 somaclones of triticale induced by gamma rays and *in vitro* culture**.** In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective:* simpozion șt. intern., 3-4 oct. 2022. Ed. a 6-a. Chişinău, 2022, pp. 47-49. ISBN 978-9975-159-81-4. DOI:10.53040/abap6.2022.15.
81. **CIOBANU, R.** The Assessment of Genetic Polymorphism in Triticale SC1 Somaclones using RAPD - PCR Markers. In: *SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science.* 2023, Volume 10 Issue 1, pp. 9-17, ISSN: 2394-2568. https://doi.org/10.14445/23942568/IJAES-V10I1P102.
82. CLARINDO, W., CARVALHO, C., MENDONÇA, M. Ploidy instability in long - term *in vitro* cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry. In: *Plant Growth Regulation*. 2012, vol. 68(3), pp. 533-538. ISSN 1435-8107 (online). DOI: 10.1007/s10725-012-9740-0.
83. CLARKE, F., CLARKE, J., AMES, N., KNOX, R. and ROSS, R. Gluten index compared with SDS - sedimentation volume for early generation selection for gluten strength in durum wheat. In: *Canadian Journal of Plant Science*. 2010, vol. 90(1), pp. 1-11. ISSN 0008-4220 (print); ISSN 1918-1833 (online).
84. CLEWER, A., SCARISBRICK, D. *Practical statistics and experimental design for plant and crop science*. Wiley John & Sons, LTD, Chichester, UK, 2001, 346p. ISBN 0471899089 (PPC).
85. COLLARD, B., and MACKILL, D. Marker - assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty - first century. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008, vol. 363, nr 1491, pp. 557-572. ISSN 1471-2970 (online).
86. CURRAIS, L., LOUREIRO, J., SANTOS, C., CANHOTO, J. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2013, vol. 114(2), pp. 149-159. ISSN 1573-5044 (online). https://doi.org/10.1007/s11240-013-0311-5.
87. DA LUZ, V., DA SILVEIRA, S., DA FONSECA, G., GROLI, E., FIGUEIREDO, R., BARETTA, D. Identification of variability for agronomically important traits in rice mutant families. In: *Bragantia*. 2016, vol. 75, pp. 41-50. ISSN 1678-4499 (online). DOI: 10.1590/1678-4499.283.
88. DAS, A., MUKHERJEE, P., GHORAI, A., JHA, T. Comparative karyomorphological analyses of *in vitro* and *in vivo* grown plants of *Aloe vera* L. Burm. F. In: *Nucleus*. 2010, vol. 53, pp. 89-94. ISSN1949-1042.
89. DENNETT, A., WILKES, M., TRETHOWAN, R. Characteristics of modern triticale quality: the relationship between carbohydrate properties, alpha - amylase activity, and falling number. In: *Cereal Chemistry*. 2013, vol. 90, pp. 594-600. ISSN 0009-0352 (print). https://doi.org/10.1094/CCHEM-10-12-0129-R.
90. DEV N., SANTOSH R., MAHENDRA P., TRIPATHI, NARAYAN, K. Genetic variability and correlation coefficients of major traits in early maturing rice under rainfed

lowland environments of Nepal. In: *Advances in Agriculture*. 2019, vol. 2019(1), pp. 1-9. ISSN 2356-654X. Article ID 5975901.
91. DEY, T., SAHA, S., GHOSH, P. Somaclonal variation among somatic embryo derived plants - evaluation of agronomically important somaclones and detection of genetic changes by RAPD in *Cymbopogon winterianus*. In: *South African Journal of Botany*. 2015, vol. 96, pp. 112-121. ISSN 0254-6299.
92. DINNENY, J., LONG, T., WANG, J., JUNG, J., MACE, D., POINTER, S., BARRON, C. et al. Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. In: *Science*. 2008, vol. 16, 320 (5878), pp. 942-945. DOI: 10.1126/science.1153795. Epub 2008 Apr 24. ISSN 1095-9203 (online).
93. DINNENY, J., BENFEY, P. Plant stem cell niches: Standing the test of time. In: *Cell*. 2008, vol. 132, pp. 553-557. ISSN 1097-4172 (online).
94. DODIG, D., ZORIC, M., MITIC, N., NIKOLIC, R., SURLAN-MOMIROVIC, G. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2008, vol. 95, pp. 107-114. ISSN 1573-5044 (online).
95. DRAGOV, R., DECHEV, D., TANEVA, K. Genetic distance of new Bulgarian durum wheat varieties and breeding lines of FCI – Chirpan, Bulgaria. In: *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*. 2019, vol. 3(3), pp. 402-410. ISSN, 2602-4772.
96. DRAGOV, R., ZLATINA, UHr, DIMITROV, E. Genetic variability, heritability and genetic advance for important quantitative traits related to the productivity and quality in F_2 generation of durum wheat: Part II. In: *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2022, vol. 28(4), pp. 699-708. ISSN 2534-983X (online).
97. DREGER, M., MÓL, R., DEJA, A., RAJ, E., MAŃKOWSKA, G., WIELGUS, K. Improved plant regeneration in callus cultures of *Sorghum bicolor* (L.). In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2019, vol. 55(2), pp. 190-198. ISSN 1054-5476. https://doi.org /10.1007/s11627-019-09963-9.
98. DUCLERCQ, J., SANGWAN - NORREEL, B., CATTEROU, M., SANGWAN, R. De novo shoot organogenesis: From art to science. In: *Trends in Plant Science*. 2011, vol. 16, pp. 597-606. ISSN 1360-1385.
99. DURNIKIN, D., KOLPAKOV, N., GUSEVA, K., MATSYURA, A. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* rooting of some potato varieties. In: *Ukrainian Journal of Ecology*. 2019, vol. 9(4), pp. 679-689. ISSN 2520-2138.
100. DUTA-CORNESCU, G., CONSTANTIN, N., POJOGA, D., NICUTA, D., SIMON-GRUITA, A. Somaclonal, variation - advantage or disadvantage in micropropagation of the medicinal plants. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, vol. 24(1), p. 838. ISSN 1422-0067. Disponibil: https://doi.org/10.3390/ijms24010838.
101. EBEN VON W., FOSSEY, A., BOOYSE, M. Efficiency of energy conversion and growth of gamma irradiated embryos and young seedlings of *Triticum monococcum* L. cultivar Einkorn. In: *Journal of Radiation Research and Applied Sciences.* 2018, vol. 11(1), pp. 75-82. ISSN1687-8507.
102. EECKHAUT, T., VAN HOUTVEN, W., BRUZNICAN, S., LEUS, L., VAN HUYLENBROECK, J. Somaclonal variation in *Chrysanthemum*×*morifolium* protoplast regenerants. In: *Frontiers in Plant Science*. 2020, vol. 11, 2104. ISSN 1664-462X. DOI: 10.3389/fpls.2020.607171.
103. EL-BANNA, H. Indirect micropropagation of *Thymus vulgaris* plant. In: *Journal of Plant Production*. 2017, vol. 8, pp. 1241-1246. ISSN 1735-8043.
104. EL-FATTAH, A., HARIDY, A. Agro - morphological and molecular analysis of somaclonal variation among regenerated plants from tomato (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) varieties. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2019, vol. 10(3), pp. 57-71. ISSN 0268-2575. DOI:10.21608/jacb.2019.36827.
105. EVANS, D., SHARP, W. and MEDINA-FILHO, H. Somaclonal and gametoclonal variation. In: *American Journal of Botany*. 1984, vol. 71, pp. 759-774. ISSN 1537-2197.
106. FALCONER, D., MACKAY, F. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, New York, 1996. 464p. ISBN 0-582-016428.
107. *FAO Food and Agricultural Organization of the United Nations*. Rome, Italy, 2016. ISBN 978-92-5-109374-0.
Disponibil: https://www.fao.org/3/i6030e/i6030e.pdf; http://www.fao.org/faostat/.
108. *FAO/IAEA - MVD*. Food and agriculture organization of the United Nations/International atomic energy agency – mutant variety database. Accessed on March 30, 2019.
Available online: https://mvd.iaea.org/#!Search.
109. *FAO/IAEA* Mutant Variety Data base of the joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture. 2020.
110. *FAO/IAEA. MVD - Search*. (s.f.). Available online: https://mvd.iaea.org/#!Search [accessed on 21 January 2021].
111. *FAO/IAEA*. Mutant Variety Database (MVD). Available online: https://mvd.iaea.org/. [accessed 19 April 2022].
112. *FAOSTAT, 2012*. Foodand Agriculture Organization. Statistical Databases. Disponibil: http://faostat.fao.org/. [accessed 17 November 2013].
113. FARAHANI, F., YARI, R., MASOUD, S. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*). In: *Gene Conserve*. 2011, vol. 10, pp. 216-221. ISSN 1808-1878.
114. FERRARI, E., FERREIRA, V., GRASSI, E., PICCA, A., PACCAPELO, H. Genetic parameters estimation in quantitative traits of a cross of triticale (x *Triticosecale* W.). In: *Open Agriculture*. 2018, vol. 3, pp. 25-31. ISSN 2391-9531.
115. FERREIRA, M., ROCHA, A., NASCIMENTO, F., OLIVEIRA, W., SOARES, J., REBOUÇAS, T. et al. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: A Systematic Review. In: *Agronomy*. 2023, vol. 13(3), pp. 730. ISSN 2073-4395. Disponibil: https://www.mdpi.com/2073-4395/13/3/730.
116. FERREIRA, M., MOURA, É., LINO, L., AMORIM, E., SANTOS-SEREJO, J., HADDAD, F. Selection of somaclonal variants of the cultivar 'Prata - Anã' for resistance to *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* race 1. In: *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2020, vol. 42, pp. 1-10. ISSN 0100-2945.
117. FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what These terms mean in the era of molecular plant biology. In: *Front. Plant. Sci*. 2019, vol. 10, pp. 536. ISSN 1664-462x. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536.
118. FILIPPOV, M., MIROSHNICHENKO, D., VERNIKOVSKAYA, D., DOLGOV, S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006, vol. 84(2), pp. 213-222. ISSN 1573-5044 (online).
119. *Food and Agriculture Organization (FAO)*. The future of food and agriculture – trend sand challenges. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017, vol. 296, pp. 1-180. 23 January 2021.
Disponibil: http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf.
120. FRANCISCO, J., LOPEZ, S., CANTAMUTTO, M., DOMENECH, M. Effect of different gamma radiation doses on the germination and seedling growth of wheat and triticale cultivars. In: *Australian Journal of Crop Science*. 2018, vol. 12(12), pp. 1921-1926. ISSN 1835-2707.

121. FU, G., HAIDAO, Z., WU, L., XINGMING, H., NING, H., QIAN, Q., LIN, X, HONGWU, B. Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and arabidopsis. In: *Plant & Cell Physiology*. 2018, vol. 59(9), pp. 1782-1789. ISSN 0032-0781. https://doi.org/10.1093/pcp/pcy095.
122. FU YONG BI. Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. In: *Theoretical and Applied Genetics*. 2015, vol. 128(11), pp. 2131-2142. ISSN 1432-2242 (Online).
123. FURMAN, B., QUALSET, C., SKOVMAND, B. et al. Characterization and analysis of North American triticale genetic resources. In: *Crop Science*. 1997, vol. 37(6), pp. 1951-1959. ISSN 1435-0653.
124. GALLI, Z., HALASZ, G., KISS, E., HESZKY, L., DOBRANSZKI, J. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. In: *Hort Science*. 2005, vol. 40(7), pp. 1974-1977. ISSN 2327-9834 (online).
125. GAO, X., YANG, D., CAO, D., AO, M., SUI, X., WANG, Q., KIMATU, J., WANG, L. *In vitro* micropropagation of Freesia hybrid and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. In: *Journal of Plant Growth Regulation*. 2010, vol. 29, pp. 257-267. ISSN 1435-8107 (online). DOI: 10.1007/s00344-009-9133-4.
126. GHIORGHITĂ, G. A journey into of the universe of *in vitro* cultures of plants callogenesis. In: *Environment and Natural Resources Research*. 2019, vol. 9(4), pp. 45-60. ISSN 1927-0488. DOI:10.5539/enrr.v9n4p45.
127. GHIORGHITĂ, G., HÂRTAN, M., MAFTEI, D., NICUTĂ, D. Some considerations regarding the *in vitro* culture of *Rhodiola rosea* L. In: *Romanian Biotechnological Letters*. 2011, vol. 16, pp. 5902-5908. ISSN 1224 - 5984.
128. GHOSH, A., IGAMBERDIEV, A., DEBNATH, S. Tissue culture induced DNA methylation in crop plants. In: *Molecular Biology Reports*. 2021, vol. 48(1), pp. 823-841. ISSN 1573-4978 (online). https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6.
129. GIDEON SADIKIEL, M. Challenges and prospects in using biotechnological interventions in *O. glaberrima*, an african cultivated rice. In: *GM Crops & Food*. 2022, vol. 13(1), pp. 372-387. ISSN 2164-5701 (online).
130. *Global strategy for the ex situ conservation with enhanced access to wheat, rye and triticale genetic resources*. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). 2007. 20 Aug 2018. Disponibil:https://www.croptrust.org/wp/wp-content/uploads/2015/05/Wheat-Strategy-FINAL20 Sep07.pdf.
131. GOKHALE, M., BANSAL, Y. Assessment of genetic fidelity in somaclonal variants with cytological and RAPD analysis in *Oroxylum indicum* (L.) Vent. An endangered medicinal tree. In: *Indian Journal of Biotechnology*. 2015, vol. 14, pp. 581-584. ISSN: 0975-0967 (online).
132. GÓRAL, H., TYRKA, M., SPISS, L. Assesing genetic variation to predict the breeding value of winter triticale cultivars and lines. In: *Journal of Applied Genetics*, 2005, vol. 46(2), pp. 125- 131. ISSN 2190-3883.
133. GOVINDARAJ, M., VETRIVENTHAN, M. and SRINIVASAN, M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. In: *Genetics Research International*. 2015. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383386/.
134. GUBIŠOVÁ, M., MIHÁLIK, D., GUBIŠ J. Optimization of barley mature embryo regeneration and comparison with immature embryos of local cultivars. In: *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2011, vol. 11(1), p. 57-62. ISSN 1339004X (online).
135. GUO, F., ZHANG, H., LIU, W., HU, X., HAN, N., QIAN, Q., XU, L., BIAN, H. Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and arabidopsis. In: *Plant*

& Cell Physiology. 2018, vol. 59(9), pp. 1782-1789. ISSN 0032-0781 (print). DOI:10.1093/pcp/pcy095.
136. GUPTA, S., KHANNA, V., SINGH, R., GARG, G. Identification of *in vitro* responsive immature embryo size for plant regeneration in Sudan grass (*Sorghum sudanenses* Piper). In: *Indian Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, pp.124-127. ISSN 0975-0967 (Online).
137. HAKAM, N., UDUPA, S., RABHA, A., IBRIZ, M., IRAQI, D. Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat using immature and mature embryos. In: *International Journal of Bio Technology and Research*. 2015, vol. 3(1), pp. 001-009. ISSN 2328-3505.
138. HALILOQLU, K., BAENZIGER, P. Screening Wheat Genotypes for High Callus Induction and Regeneration Capability from Immature Embryo Cultures. In: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2005, vol. 14, pp. 155–160. ISSN 0971-7811 (Print) https://doi.org/10.1007/BF03263244.
139. HALILOGLU, K., AYDIN, M. Efficient regeneration system from rye leaf base segments. In: *Springer Plus*. 2016, vol. 5(1), 2005. ISSN 2193-1801. DOI 10.1186/s40064-016-3689-9. Disponibil: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC5121110/.
140. HAMMOUDA, D., BAAZIZ, N., KHALFALLAH, N., Genetic characterization of octoploid (AABBDDRR) and hexaploid (AABBRR) triticales. In: *European scientific journal*. 2015, vol. 11(9), pp. 284-296.
141. HAMOUDA, M. Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt. In: *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2019, vol. 17(1), p.12. ISSN 2090-5920 (online).
142. HAN, A., HONG, M., NAM, B., KIM, B., PARK, H., BAEK, I., KIL, Y., NAM, J., JIN, C., KIM, J. Comparison of flavonoid profiles in sprouts of radiation breeding wheat lines (*Triticum aestivum* L.). In: *Agronomy.* 2020, vol. 10, p. 1489. ISSN 2073-4395. DOI: 10.3390/agronomy10101489.
143. HANNACHI, S., WERBROUCK, S., BAHRINI, I., ABDELGADIR, A., AFFAN SIDDIQUI, H. Agronomical, physiological and biochemical characterization of *in vitro* selected eggplant somaclonal variants under NaCl stress. In: *Plants*. 2021, vol. 10, 2544. ISSN 2223-7747. Disponibil: https://doi.org/10.3390/ plants10112544.
144. HARDING, S. Effect of gamma rays on seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. In: *American Journal of Experimental Agriculture*. 2012, nr 2, pp. 247-255. ISSN 2231-0606. DOI: 10.9734/AJEA/2012/820.
145. HASAN, N., CHOUDHARY, S., NAAZ, N., SHARMA, N., LASKAR, R. Recent advancements in molecular marker - assisted selection and applications in plant breeding programmes. In: *J Genet Eng Biotechnol*, 2021 Aug 27, vol. 19(1), pp. 128. doi: 10.1186/s43141-021-00231-1. PMID: 34448979; PMCID: PMC8397809.
146. HE, T. and JIA, J. High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hk. f.) under endosperm - supported culture. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008, vol. 95(2), pp. 251-254. ISSN 1573-5044 (online).
147. HENRY, R. Molecular markers in plant improvement. In: *Practical Applications of Plant Molecular Biology*. Editor: Robert J. HENRY. Chapman & Hall, London, UK: Garland science, 1997. pp. 102-135. ISBN 97804127322201.
148. HERNÁNDEZ, M., PEDRAZA, S., ANTONIO, L., GÓMEZ, S., MORALES, G. Mutagenesis in the improvement of ornamental plants. In: *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 2019, vol. 25, pp. 151-167. ISSN 2007-4034.

149. HIGGINS, S., ROSE, K., WILSON, R., FRANCIS, R., WATSON, C. and RILEY, C. *In vitro* propagation of *Zingiber officinale* Rosc. In: *European Journal of Experimental Biology*. 2021, vol. 11(3), p. 129. ISSN 2248-9215.
150. HONG, M., KIM, D., JO, Y., CHOI, H., AHN, J., KWON, S., KIM, S., SEO, Y., KIM, J. Biological effect of gamma rays according to exposure time on germination and plant growth in wheat. In: *Applied Sciences*. 2022, vol. 12, p. 3208. ISSN 2076-3417. https://doi.org/10.3390/ app12063208.
151. HONG, M., KIM, D., NAM, B., AHN, J., KWON, S., SEO, Y., KIM, J. Characterization of novel mutants of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) with various depths of purple grain color and antioxidant capacity. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019, vol. 99, pp. 55-63. ISSN 1097-0010.
152. HOSHYAR, A., IBRAHIM, K. POP, R., PAMFIL, D., HÂRȚA, M., BOBIȘ, O. Changes induced by gamma ray irradiation on biomass production and secondary metabolites accumulation in *Hypericum triquetrifolium* Turra, callus cultures. In: *Industrial Crops and Products.* 2017, vol. 108, pp. 183-189. ISSN 0926-6690. https://doi.org/10.101 6/j.indcrop.2017.06.040.
153. HOSSEIN POUR, A., AYDIN, M., HALILOGLU, K. Plant regeneration system in recalcitrant rye (*Secale cereale* L.). In: *Biologia*. 2020, vol. 75(7), pp. 1017-1028. ISSN 1336-9563 (online). https://doi.org/10.2478/s11756-019-00395-9.
154. https://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg121.pdf [citat 10.07.2021].
155. HUSSEIN, H., ALSHAMMARI, S., ELKADY, F., RAMADAN, A., KENAWY, S., ABDELKAWY, A. Radio - protective effects of stigmasterol on wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Plants. Antioxidants (Basel)*. 2022, vol.11 (6), p. 1144. DOI: 10.3390/antiox11061144. PMID: 35740045; PMCID: PMC9220132.
156. IGREJAS, G., GUEDES-PINTO, H., CARNIDE, V., BRANLARD, G. Seed storage protein diversity in triticale varieties commonly grown in Portugal. In: *Plant Breeding*. 1999, vol. 118, pp. 303-306. ISSN 14390523. https://doi. org/10.1046/j.1439-0523.1999.00379.x.
157. IJAZ, B., SUDIRO, C., HYDER, M. Histo - morphological analysis of rice callus cultures reveals differential regeneration response with varying media combinations. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2019. ISSN 1054-5476 (print). DOI: 10.1007/s11627-019-09974-6.
158. IKEUCHI, M., OGAWA, Y., IWASE, A., SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. In: *Development*. 2016. vol. 143, pp. 1442–1453. ISSN 1477-9129 (online) DOI: 10.1242/dev.134668.
159. IKEUCHI, M., SHIBATA, M., RYMEN, B. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. In: *Plant Cell Physiol*. 2018. vol. 59, pp. 770–782. ISSN 0032-0781 (Print). DOI: 10.1093/pcp/pcy013.
160. IMTIAZ, A., MUHAMMAD, U., NIGHAT, S., SHAFQAT, Y., SAJIDA, B., SABOOHI, R. Genetic variability in sugarcane plantlets developed through *in vitro* mutagenesis. In: *Pakistan Journal of Botany*. 2009, vol. 41(1), pp. 153-166. ISSN 5563-321.
161. IONESCU, N., BADEA, O., POPESCU, D., NICOLAE M. Morphological variability in the new varieties of triticale, haiduc and fdl bolid. In: *Current Trends in Natural Sciences*. 2022, vol. 11, Issue 22, pp. 328-336. ISSN 2284-953x https://do i.org/10.47068/ctns.2022.v11i22.038.
162. ISLAM, M., RAHMAN, M., HASANUZZAMAN, M., ISLAM, M., UDDIN, M., SAHA, N. *In vitro* response and effect of gamma irradiation on four local indica rice varieties. In: *Journal of Scientific Agriculture*. 2020, vol. 4, pp. 90-92. ISSN 2184-0261 (online). https://doi.org/10.25081/jsa.2020.v4.6307 ISSN: 2184-0261.

163. IVANOVA, M., NOVAK, O., STRNAD, M., VAN STADEN, J. Endogenous cytokinin in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. In: *Plant Growth Regulation*. 2006, vol. 50, pp. 219-230. ISSN 1435-8107 (online).
164. JACOBSON, A. and HEDREN, M. Phylogenetic relationships in Alisma (*Alismataceae*) based on RAPDs, and sequence data from ITS and trnL. In: *Plant Systematics and Evolution*. 2007, vol. 265(1-2), pp. 27-44. ISSN 0378-2697.
165. JAIN, S., PARWEEN, T., SIDDIQI, T. Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. In: *Environmental Reviews*. 2012, vol. 20, pp. 17-39. ISSN 12086053.
166. JAIN, S., MOHAN, G., PRAMOD, K. *Step wise protocols for somatic embryogenesis in woody plants*. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018, vol. 1-2. ISBN-13: 978-3319790862.
167. JANUSZ, Z. and MICHALSKI, K. Development of *in vitro* culture techniques for advancement of rye (*Secale cereale* L.) breeding. In: *Acta biologica cracoviensia. Ser. Botanica*. 2019, vol. 61(1), pp. 7-15. ISSN 1898-0295.
168. JIANG, J., GILL, B. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. In: *Genome*. 2006, vol. 49(9), pp. 1057-1068. ISSN 1480-3321 (online).
169. JINGQI, S., CHENLU, Z., ZHANGHUI, Z., XIPU, L., HONGWU, B. Identification of regulatory factors promoting embryogenic callus formation in barley through transcriptome analysis. In: *BMC Plant Biology*. 2021, vol. 21, p. 145. ISSN 0960-7412 (print). Disponibil: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-116630/v1.
170. JOYCE, S., CASSELLS, A., JAIN, S. Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003, vol. 74(2), pp. 103-121. ISSN 1573-5044 (online).
171. KAABY, E., AL-JIBOURI, A., ALSALHY, A., AL-AUBAIDY, A., ZAMIL, Q. Effect of gamma radiation on callus induction and plant regeneration of four wheats *Triticum aestivum* L. genotypes. In: *Baghdad Science Journal* [Internet]. 2021, vol. 4(3), pp. 363-368. Mar. 10 [cited 2023 May 7]. P-ISSN 2078-8665, E-ISSN 2411-7986.
172. KAEPLER, S., KAEPLER, H., RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. In: *Plant Molecular Biology*. 2000, vol. 43, pp. 179-188. ISSN 1573-5028 (Online).
173. KACEM, N., DELPORTE, F., MUHOVSKI, Y., DJEKOUN, A., WATILLON, B. *In vitro* screening of durum wheat against water - stress mediated through polyethylene glycol. In: *J Genet Eng Biotechnol*. 2017, vol. 15(1), pp. 239-247. ISSN: 2090-5920 (online). doi:10.1016/j.jgeb.2017.04.004.
174. KALINKA, A., ACHREM, M. Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid triticale. In: *Planta*. 2018, vol. 247(4), pp. 807-829. ISSN 1432-2048 (online).
175. KAR, B., KUANAR, A., SINGH, S., MOHANTY, S., JOSHI, R., SUBUDHI, E., NAYAK, S. *In vitro* induction, screening and detection of high essential oil yielding somaclones in turmeric (*Curcuma longa* L.). In: *Plant Growth Regulation*. 2014, vol. 72(1), pp. 59-66. ISSN 1435-8107 (online).
176. KATO, T., HASKINS, J. Mitotic index analysis. In: *Methods in Molecular Biology*. 2023, vol. 2519, p. 17-26. ISSN1940-6029. DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_3. PMID: 36066706.
177. KAUR, S, AVINASHE, H., DUBEY, N., KALUBARME, S., KUMAR, M. Assessment of genetic variability and association analysis for yield and yield attributing traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Plant Archives*. 2019, vol. 19(1), pp. 1261-1267. ISSN 2581-6063 (online).

178. KAVIANI, B., HESAR, A., TARANG, A., ZANJANI, S., HASHEMABADI, D., ANSARI, M. Effect of kinetin (Kn) and naphthalene acetic acid (NAA) on the micropropagation of Matthiola incana using shoot tips, and callus induction and root formation on the leaf explants. In: *African Journal of. Agricultural Research*, 2013, vol. 8(30), pp. 4134-4139. ISSN 1991-637X. Doi: 10.5897/AJAR.
179. KENENI, G., BEKELE, E., IMTIAZ, M. et al. Genetic vulnerability of modern crop cultivars: causes, mechanism and remedies. In: *International Journal of Plant Research*. 2012, vol. 2(3), pp. 69-79. ISSN 2163-2596.
180. KENZHEBAYEVA, S., DOKTYRBAY, G., SARSU, F., OMIRBEKOVA, N., ABEKOVA, A., TASHENEV, D. Mutant resources of spring wheat to improve grain quality and morphology. In: *Global Wheat Production*. 2018, p. 250. DOI: 10.5772/intechopen.75706.
181. KENZHEBAYEVA, S., ATABAYEVA, S., SARSU, F., ABEKOVA, A., SHOINBEKOVA, S., OMIRBEKOVA, N., DOKTYRBAY, G., BEISENOVA, A., SHAVRUKOV, Y. Organ - specific expression of genes involved in iron homeostasis in wheat mutant lines with increased grain iron and zinc content. In: *PeerJ*. 2022, vol. 10, e13515. ISSN 2167-8359. DOI: 10.7717/peerj.13515.
182. KHAN, S., SAEED, B., KAUSER, N. Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. In: *Pakistan Journal of Botany*. 2011, vol. 43, pp. 233-242. ISSN 0556-3321.
183. KNÜPFFER, H. Triticeae genetic resources in ex situ genebank collections. In: *Genetics and genomics of the Triticeae. Plant genetics and genomics: crops and models*. Berlin, 2009, vol. 7, pp. 31-79. ISBN 978-0387774886.
184. KOROTIMI, D., MOUMOUNI, K., HAMED M., JACOB, S., MAHAMADOU, S. Importance, genetic diversity and prospects for varietal improvement of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Burkina Faso. In: *World Journal of Agricultural Research*. 2021, vol. 9(3), pp. 92-99. ISSN 2333-0678 (Online). DOI: 10.12691/wjar-9-3-3.
185. KRAMEK, A., KOCIUBA, W. Characteristics of winter Triticale genetic resources regarding field resistance to fungal diseases. In: *Annales Universitatis Mariae Curie - Skłodowska*. Lublin-Polonia, 2014, sectio E : Agricultura, vol. 69, pp. 113-117. ISSN 0365-1118.
186. KRASIMIRA, T., BOZHANOVA, V., PETROVA, I. Variability, heritability and genetic advance of some grain quality traits and grain yield in durum wheat genotypes. In: *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2019, vol. 25(2), pp. 288-295. ISSN 2534-983X (online).
187. KRISHNA, H., ALIZADEH, M., SINGH, D. et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. In: *3 BIOTECH. 2016*. 6(1), p. 54. ISSN 2190-5738 (online). https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7.
188. KUMAR, V., SINHA, A., MAKKAR, H. et al. Dietary roles of non - starch polysaccharides in human nutrition: a review. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, vol. 52, pp. 899-935. ISSN 1549-7852. Disponibil: https://doi.org/10.1080/10408398.20 10.512671.
189. KUZNETSOVA, O., ASH, O., GOSTIMSKY, S. The effect of the duration of callus culture on the accumulation of genetic alternation in pea *Pisum sativum* L. In: *Russian Journal of Genetics*. 2006, vol. 42, pp. 555-562. ISSN 1608-3369 (online). DOI:10.1134/S1022795406050139.
190. KWIATEK, M., BANASZAK, Z., SKOWROŃSKA, R. Spike morphology alternations in androgenic progeny of hexaploid triticale (× *Triticosecale* Wittmack) caused by nullisomy of 2R and 5R chromosomes. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant, 2020, vol.* 56, pp. 150–158. ISSN 1054-5476 (print). https://doi.org/10.1007/s11627-019-10021-7.

191. LARKIN, P., SCOWCROFT, W. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. In: *Theoretical and Applied Genetics*. 1981, vol. 60(4), pp. 197-214. ISSN 0040-5752 (print). ISSN 1432-2242 (online).
192. LEE, M. and PHILLIPS, R. The Chromosomal basis of somaclonal variation. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1988, vol. 39, pp. 413-437. ISSN 1040-2519.
193. LEE, K., SEO, P. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration. In: *Trends in Plant Science*. 2018, vol. 23(3), pp. 235-247. ISSN 1360-1385. Disponibil: https://doi.org/10.1016/j. tplants.2017.11.009.
194. LO, S., FAN, M., HSING, Y., CHEN, L., CHEN, S., WEN, I. Genetic resources offer efficient tools for rice functional genomics research. In: *Plant, Cell & Environment*. 2016, vol. 39, pp. 998-1013. ISSN 1365-3040 (online). DOI: 10.1111/pce.12632.
195. LONG, Y., YANG, Y., PAN, G., SHEN, Y. New insights into tissue culture plant - regeneration mechanisms. In: *Frontiers in Plant Science*.2022, vol. 13, 926752. ISSN 1664-462X. DOI: 10.3389/fpls.2022.926752. PMID: 35845646; PMCID: PMC9280033.
196. LUDOVICI, G., OLIVEIRA DE SOUZA, S., CHIERICI, A., CASCONE, M., D'ERRICO, F., MALIZIA, A. Adaptation to ionizing radiation of higher plants: From environmental radioactivity to chernobyl disaster. In: *Journal of Environmental Radioactivity*. 2020, vol. 222, 106375. ISSN 0265-931X.
DOI: 10.1016/j.jenvrad. 2020.106375. Epub 2020 Aug 10.
197. LUNDQVIST, U. Eighty years of Scandinavian barley mutation genetics and breeding. In: *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Editory: Q.Y. SHU. Rome, 2009, pp. 39-43.
Disponibil: https://www.fao.org/3/i0956e/I0956e.pdf#page=35.
198. MA, X., GUSTAFSON, J. Allopolyploidization - accommodated genomic sequence changes in Triticale. In: *Annals of Botany*. 2008, vol. 101(6), pp. 825-832. ISSN 0305-7364.
199. MACHCZYŃSKA, J., ORŁOWSKA, R., OGÓREK, K., BEDNAREK, P. Comparative study on tissue culture induced variation identifed with met AFLP and RP – HPLC in barley and triticale regenerants. In: *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 2015, vol. 96(1), pp. 98-99. ISSN 0860-7796.
200. MACHCZYŃSKA, J., ZIMNY, J., BEDNAREK, P. Tissue culture - induced genetic and epigenetic variation in triticale (×*Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. In: *Plant Molecular Biology*. 2015, vol. 89(3), pp. 279-292. ISSN 1573-5028 (online). DOI:10.1007/s11103-015-0368-0.
201. MAHMOOD, I., RAZZAQ, A., QURESHI, A., QAYYUM, A., BAIG, M. Comparative morpho - physiological response of *in vitro* selected somaclones of wheat (*Triticum aestivum* L.) and explant donor parent to drought stress. In: *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. 2018, vol. 46, pp. 293-302. ISSN 2362-0161 (online).
202. MALIK, K., BIRLA, D., YADAV, H., SAINGER, M., CHAUDHARY, D., JAIWAL, P. Evaluation of carbon sources, gelling agents, growth hormones and additives for efficient callus induction and plant regeneration in Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using mature embryos. In: *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2017, vol. 20, pp. 185-192. ISSN 2005-8276.
DOI: 10.1007/s12892-017-0046-0.
203. MALUSZYNSKI, M., NICHTERLEIN, K., VAN ZANTEN, L., AHLOOWALIA, S. Officially released mutant varieties - the FAO/IAEA Database. In: *Mutation breeding review*. Vienna, 2000, nr 12, pp. 1-84. ISSN 1011-2618. Disponibil: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Newsletters/MB-REV-12.pdf.

204. MANFRED, E., AKROMAH, R. Genetic variability, coefficient of variance, heritability and genetic advance of pro - vitamin a maize hybrids. In: *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2017, vol. 6(1). ISSN 2319-1473(online).
205. MARALAPPANAVAR, M., KURUVINASHETTI, M., HARTI, C. Regeneration, establishment and evaluation of soma clones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. In: *Euphytica*. 2000, vol. 115, pp. 173-180. ISSN 0014-2336 (print).
206. MARÍA de la LUZ, R., CADENA-IÑIGUEZ, J., RUIZ-POSADAS, L. Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties. In: *Plants* (Basel). 2022, vol. 11(9), p. 1161. ISSN 2223-7747.
207. MAYAVEL, A., VIKASHINI, B., BHUVANAM, S., SHANTHI, A., KAMALAKANNAN, R., KI-WON, K., KANG, K. RAPD polymorphism and genetic distance among phenotypic variants of *Tamarindus indica*. In: *Journal of Korean Society Forest Science*. 2020, vol. 109(4), pp. 421-428. ISSN 2586-6621.
208. Mc GOVERIN, C., SNYDERS, F., MULLER, N., BOTES, W., FOX, G., MANLEY, M. A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, vol. 91(7), pp. 1155-1165. ISSN 0022-5142. DOI: 10.1002/jsfa.4338. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21433010.
209. MEHMET, A., KAYA, M., KHAWAR, K. , SAGLAM, S., ÖZCAN, S. Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes. In: *African Journal of Biotechnology*. 2008, vol. 7(11), pp. 1765-1768. ISSN 1684-5315.
210. MELAHAT, A. and ÖZGEN, M. Comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (x *Triticosecale* Wittmack). In: *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2004, vol. 9, pp 353-361. ISSN 1689-1392 (online). http://www.cmbl.org.p.
211. MELCHINGER, A. Genetic diversity and heterosis. In: *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Crop Science Society of America*. Eds.: J.G. COORS, S. PANDEY. 1999, pp. 99-118. https://doi.org/10.2134/1999.geneticsandexplo itation.c10.
212. MENDOZA, M., KAEPPLER, H. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2002, vol. 38(1), pp. 39-45. ISSN 1054-5476 (print).
213. MENÉNDEZ-YUFFÁ, A., BARRY-ETIENNE, D., BERTRAND, B., GEORGET, F. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large - scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2010, vol. 102, pp. 297-307. ISSN 1573-5044 (online). DOI:10.1007/s11240-010-9734-4.
214. MERGOUM, M., SAPKOTA, S., NARAGHI, S., PIRSEYEDI, S., ALAMRI, M., ABUHAMMA, W. *Triticale (x Triticosecale* Wittmack*) Breeding*. USA: Springer International Publishing, 2019, 451 p. DOI: 10.1007/978-3-03023108-8_11.
215. MERGOUM, M., SINGH, P., PENA, R. et al. Triticale: a "new" crop with old challenges. In: *Cereals*. Editor M.J. CARENA. New York: Springer, 2009, pp. 267-287. ISBN 978-0387722948. Disponibil: https://www.researchgate.net/publication/226295649_Triticale_A_New_Crop_with_Old_Challenges.
216. MERGOUM, M., PFEIFFER, W., PENA, R. et al. Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. In: *Triticale improvement and production. (FAO Plant production and protection paper no 179)*. Rome: FAO, 2004, pp. 11-26. ISBN 978-9251051825.

217. MIGUEL, C., MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro* somaclonal variation and beyond. In: *Journal of Experimental Botany*. 2011, vol. 62, pp. 3713-3725. ISSN 0022-0957 (print). ISSN 1460-2431 (online).
218. MIROSHNICHENKO, D., CHERNOBROVKINA, M., DOLGOV, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Triticum timopheevii* Zhuk. and *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch, wheat species with G genome. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016, vol. 125, pp. 495-508. ISSN 0167-6857. DOI: 10.1007/s11240-016-0965-x.
219. MISHCHENKO, S., KRIVOSHEEVA, L. *In vitro* callusogenesis and organogenesis of different *Linum usitatissimum* L. In: *Генетичні ресурси рослин*. 2018, № 23. ISSN 2309-7345.
220. MOHAMED, E., OSAMA, E., MANAL, E., SAMAH, A., SALAH, G., HAZEM, K., NABIL, E. Impact of gamma irradiation pretreatment on biochemical and molecular responses of potato growing under salt stress. In: *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2021, vol. 8, p. 35. ISSN2196-5641.
221. MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A. et al. Genome mapping, molecular markers and marker - assisted selection in crop plants. In: *Molecular Breeding*. 1997, vol. 3(2), pp. 87-103. ISSN 1380-3743.
222. MOHANTY, S., PANDA, M., SUBUDHI, E., NAYAK, S. Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. In: *Biologia Plantarum*. 2008, vol. 52, pp. 783-786. ISSN 0006-3134 (print).
223. MONDINI, L., NOORANI, A., PAGNOTTA, M. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. In: *Diversity*. 2009, vol. 1(1), pp. 19-35. ISSN 1424-2818.
224. MUGUERZA, M., GONDO, T., ISHIGAKI, G., SHIMAMOTO, Y., UMAMI, N., NITTHAISONG, P., RAHMAN, M., AKASHI, R. Tissue culture and somatic embryogenesis in warm - season grasses - current status and its applications. In: *Plants*. 2022, vol. 11, p. 1263. ISSN 2223-7747. https://doi.org/10.3390/ plants11091263.
225. MUHOVA, A., KIRCHEV, H. Agronomic performance of triticale varieties (× *Triticosecale* Wittm.) grown under fertilization with organic manure from Red Californian worms (*Lumbricus rubellus*). In: *Scientic Papers. Series A. Agronomy*. 2020, vol. 63(1), pp. 428-436. ISSN 2285-5785, ISSN 2285-5807 (online).
226. MULLINS, E., BRESSON, J., DALMAY, T., DEWHURST, I., EPSTEIN, M., FIRBANK, L., GUERCHE, P., HEJATKO, J., MORENO, F., et al. *In vivo* and *in vitro* random mutagenesis techniques in plants. In: *EFSA Journal*. 2021, vol. 19(11), p. 6611-6630. ISSN 1831-4732. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6611.
227. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum*. 1962, vol. 15, pp. 473-497. ISSN 0031-9317.
228. MUSHTAQ, A., RAKESH, C. Assessment of the effects of gamma radiations on various morphological and agronomic traits of common wheat (*Triticum aestivum* L.*)* var. WH - 147. In: *European Journal of Experimental Biology*. 2015, vol. 5(7), pp. 6-11. ISSN 2248-9215.
229. NADEEM, M., NAWAZ, M., SHAHID, M., DOĞAN, Y., COMERTPAY, G., YILDIZ, M., HATIPOĞLU, R., AHMAD, F., ALSALEH, A., LABHANE, N., ÖZKAN, H. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2018, vol. 32(2), pp. 261-285. ISSN 1314-3530 (online).

230. NAHEED, R., ARFAN, M., FARHAT, F., IJAZ, S., KHALID, H. Acclimatization of drought tolerance with somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In: *Advancements in Life Sciences*. 2020, vol. 8(1), pp. 57-62. ISSN 2163-1395. Disponibil: ww.als-journal.com/ ISSN 2310-5380/ November 2020.
231. NEI M. Genetic distance betwe en populations. In: *American Naturalist*. 1972, vol. 106, p. 283-292.ISSN 0003-0147.
232. NHUT, D., HAI, N., THU, P., THI, N., HIEN, T., TUAN, T., NAM, N., HUY, N., CHIEN, H., JAIN, S. Protocol for inducing flower color somaclonal variation in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). In: *Methods in Molecular Biology*. 2013, vol. 11013, pp. 455-462. ISSN 1064-3745. DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_34.
233. NIC-CAN, G., GALAZ-AVALOS, R., DE–LA-PENA, C., ALCAZAR-MAGANA, A., WROBEL, K., LOYOLA-VARGAS, V. Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. In: *PLOS ONE*. 2015, vol. 10(6), e 0126414. ISSN 1932-6203 (online). https://doior g/1013 71/jou rnal.pone.0126414.
234. NIEDZIELA, A., ORŁOWSKA, R., MACHCZYŃSKA, J., BEDNAREK, P. The genetic diversity of triticale genotypes involved in polish breeding programs. In: *Springer Plus*. 2016, vol. 22(5), p. 355. ISSN 2193-1801. Published online 2016 Mar 22. DOI: 10.1186/s40064-016-1997-8. Disponibil:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4801839/.
235. NIKAM, A., DEVARUMATH, R., AHUJA, A., BABU, H., SHITOLE, M., SUPRASANNA, P. Radiation - induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). In: *The Crop Journal*. 2015, vol. 3(1), pp. 46-56. ISSN 2214-5141 (online). https://doi.org/ 10.1016/j.cj.2014.09.002.
236. OGWU, M., OSAWARU, M., AHANA, C. Challenges in conserving and utilizing plant genetic resources (PGR). In: *International Journal of. Genetics and Molecular Biology*. 2014, vol. 6(2), pp. 16-22. ISSN 2006-9863.
237. OM PRAKASH, B., BEHL, R., MUNJAL, R. Study on potentials of triticale as an alternative of wheat in India Suresh. In: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020, vol. 9(1), pp. 898-901. ISSN 2278-4136.
238. ORŁOWSKA, R. Barley somatic embryogenesis-an attempt to modify variation induced in tissue culture. In: *Journal of Biological Research*. 2021, vol. 28(1), p. 9. ISSN 1826-8838. https://doi.org/10.1186/s40709-021-00138-5.
239. ORŁOWSKA, R., BEDNAREK, P. Precise evaluation of tissue culture induced variation during optimisation of *in vitro* regeneration regime in barley. In: *Plant Molecular Biology*. 2020, vol. 103, pp. 33-50. ISSN 1573-5028 (online). https://doi.org/10.1007/ s11103-020-00973-5.
240. ORŁOWSKA, R. Triticale doubled haploid plant regeneration factors linked by structural equation modeling. In: *Journal of Applied Genetics*. 2022, vol. 63, pp. 677-690. ISSN 1234-1983. https://doi.org/10.1007/s13353-022-00719-7.
241. ORLOVSKAYA, O., KOREN, L., KHOTYLEVA, L. Genetic polymorphism evaluation of spring triticale (x *Triticosecale* Wittmack) samples with use of RAPD and ISSR markers. In: *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2012, vol. 2(6), pp. 508-512. ISSN 2079-0597 (print), ISSN 2079-0600 (online). http://dxdo i.org/10.11 34/s207905971206010x.
242. ÖZGE, Ç., ALP, A., SINAN, M., ÇIMEN, A. Comparison of tolerance related proteomic profiles of two drought tolerant tomato mutants improved by gamma radiation. In: *Journal of Biotechnology*. 2021, vol. 330, pp. 35-44. ISSN 0168-1656.

243. PACHOTA, K., ORŁOWSKA, R., BEDNAREK, P. Medium composition afects the tissue culture - induced variation in triticale regenerants. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2022, vol. 151(1), pp. 35-46. ISSN 0167-6857 (print). Disponibil:https://www.researchgate.net/publication/361072066_Medium_composition_affects_the_tissue_culture-induced_variation_in_triticale_regenerants.
244. PACIOREK, T., ZAZIMALOVA, E., RUTHARDT, N., PETRASEK, J., STIERHOF, Y.D., KLEINE-VEHN, J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. In: *Nature*. 2005, vol. 435, pp. 1251-1256. ISSN 1476-4687 (online). Doi: 10.1038/nature03633.
245. PADMAJA, G., REDDY, V. and REDDY, G. Somaclonal variation from regenerants of mature embryo calli of triticale. In: *Indian Journal of Experimental Biology*. 1993, vol. 31(3), pp. 238-241. ISSN 0975-1009 (online).
246. PAL, T., GHOSH, S., MONDAL, A. et al. Evaluation of genetic diversity in some promising varieties of lentil using karyological characters and protein profiling. In: *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2016, vol. 14(1), pp. 39-48. ISSN 2090-5920 (online).
247. PANE, F., LOPEZ, S., CANTAMUTTO, M., DOMENECH, M., CASTRO-FRANCO, M. Effect of different gamma irradiation doses on the germination and seedling growth of wheat and triticale cultivars. In: *Australian Journal of Crop Science*. 2018, vol. 12, pp. 1921-1926. ISSN 1835-2707.
248. PARRY, M., MADGWICK, P., BAYON, C., TEARALL, K., HERNANDEZ-LOPEZ, A., BAUDO, M. Mutation discovery for crop improvement. In: *Journal of Experimental Botany*. 2009, vol. 60(10), pp. 2817-2825. ISSN 1460-2431(online). DOI: 10.1093/jxb/erp189.
249. PATADE, V., SUPRASANNA, P. An *in vitro* radiation induced mutagenesis – selection system for salinity tolerance in sugarcane. In: *Sugar tech*. 2009, vol. 11(3), pp. 246-251. ISSN 0972-1525.
250. PATADE, V., SUPRASANNA, P. Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane improvement. In: *Sugar Tech*. 2008, vol. 10(1), pp.14-19. ISSN 0974-0740.
251. PATERSON, A. Making genetic maps. In: *Genome Mapping in Plants*. Editors A.H. PATERSON, R.G. LANDES. San Diego, Calif, USA: Academic Press, 1996, pp. 23-39. ISBN 978-0125465908.
252. PATIL, C., KOUJALAGI, D. Genetic variability study in F_2 population of tetraploid dicoccum wheat crosses. In: *Journal of Applied and Natural Science*. 2018, vol. 10(2), pp. 773-778. ISSN 2231-5209 (online).
253. PATHAK, H., DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2012, vol. 48, pp. 137-143. ISSN 1054-5476 (print).
254. PÉREZ, G., MBOGHOLI, A., SAGARRA, F., ARAGÓN, C., GONZÁLEZ, J., ISIDRÓN, M., LORENZO, J.C. Morphological and physiological characterization of two new pineapple somaclones derived from *in vitro* culture. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2011, vol. 47(3), pp. 428-433. ISSN 1475-2689 (online).
255. PETROVIČOVÁ, L., GÁLOVÁ, Z., BALÁŽOVÁ, Ž., VIVODÍK, M., WÓJCIK-JAGŁA, M., RAPACZ, M. Assessment of RAPD polymorphism in rye (*Secale cereale* L.) genotypes. In: *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2015, vol. 4 (spec. iss. 2), pp. 94-97. ISSN 1338-5178 (online). DOI:10.15414/jm bfs.2015.4.special2.94-97.
256. PLATTEN, J., COBB, J., ZANTUA, R. Criteria for evaluating molecular markers: comprehensive quality metrics to improve marker - assisted selection. In: *PLOS One*. 2019, nr 14(1). ISSN 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0210529.

Disponibil: https://journals. plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210529.
257. PLAZA-WÜTHRICH, S., BLÖSCH, R., TADELE, Z. Efficiency of *in vitro* regeneration is dependent on the genotype and size of explant in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. In: *Adv Crop Sci Tech*., 2015, vol. 3, pp.179. ISSN: 2329-8863. doi:10.4172/2329-8863.1000179.
258. PRZETAKIEWICZ, A., ORCZYK, W., NADOLSKA-ORCZYK, A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003, vol. 73(3), pp. 245-256. ISSN 1573-5044 (online).
259. PULIANMACKAL, A., KAREEM, A., DURGAPRASAD, K., TRIVEDI, Z., PRASAD, K. Competence and regulatory interactions during regeneration in plants. In: *Frontiers in Plant Science*. 2014, vol. 5, pp. 1-16. ISSN 1664-462X.
260. PYKALO, S., DEMYDOV, O., YURCHENKO, T. et al. Comparative assessment of methods for evaluation of drought tolerance in winter bread wheat varieties. In: *Science Rise: Biological Science*. 2019, vol. 4(19), pp. 17-21. ISSN 2519-8025. https://doi.org/10.15587/2519-8025.2019.186813.
261. PYKALO, S., BAVOL, A., and DUBROVNA, O. Cytogenetic features of callus cultures of winter triticale under osmotic stress action. In: *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015, vol. 17, pp. 230-235. ISSN 2415-3826 (online).
262. PYKALO, S., DUBROVNA, O. *In vitro* selection of winter triticale for resistance to salinity and analysis of obtained forms. In: *Plant Physiology and Genetics*. 2017, vol. 49(4), pp. 312-320. ISSN 2308-7099.
263. PYKALO, S. and DUBROVNAB, O. Variability of the triticale genome in culture *in vitro*. In: *Cytology and Genetics*. 2018, vol. 52(5), pp. 385-393. ISSN 0095-4527 (print).
264. QUINTANA, V., ALVARADO, L., SARAVIA, D., BORJAS, R., CASTRO - CEPERO, V., JULCA - OTINIANO, A. GÓMEZ, L. Gamma radiosensitivity of coffee (*Coffea arabica* L. var. typica) estudio de la radiosensibilidad gamma delcafé (*Coffea arabica* L. var. typica). In: *Peruvian Journal of Agronomy*. 2019, vol. 3(2), pp. 74-80. ISSN 2616-4477 (online). DOI: http://dx.doi.org/10.21704/pja.v3i2.1317. Disponibil: http://rev istas.lamolina.edu. pe/index.php/jpagronomy/index.
265. RAFIQ WANI, M., IMRAN KOZGAR, M., TOMLEKOVA, N., KHAN, S., GUL KAZI, A., AHMAD SHEIKH, S. and AHMAD, P. *Mutation breeding: A novel technique for genetic improvement of pulse crops particularly chickpea (Cicer arietinum* L.*)*. New York. Springer, 2014, chapter 9, pp. 217-248. DOI: 10.1007/978-1-4614-8824-8_9.
266. RAI, M., KALIA, R., SINGH, R., GANGOLA, M., DHAWAN, A. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – an overview of the recent progress. In: *Environmental and Experimental Botany*. 2011, vol. 71, pp. 89-98. ISSN 0098-8472.
267. RAI, M. Somaclonal variation in improvement of agricultural crops: recent progress. In: *Agricultural Biotechnology: Latest Research, and Trends*. Eds.: DINESH KUMAR SRIVASTAVA, AJAY KUMAR THAKUR, PANKAJ KUMAR. Springer Nature Pvt Ltd.: Singapore, 2021; pp. 129-146. ISBN 978-9811623400.
268. RAINA, A., LASKAR, R., WANI, M., JAN, B., ALI, S., KHAN, S. Gamma rays and sodium azide induced genetic variability in high – yielding and biofortified mutant lines in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: *Frontiers in Plant Science*. 2022, vol.13, 911049. ISSN 1664-462X (online). DOI: 10.3389/fpls.2022.911049.
269. RAIZADA, M., GORON, T., BANNERJEE, O. Loss of developmental pluripotency occurs in two stages during leaf aging in *Arabidopsis thaliana*. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*., 2017, vol. 53, pp. 178–187. ISSN 1054-5476 (Print). DOI: 10.1007/s11627-017-9813-x.
270. RAKHA, A., AMAN, P., ANDERSSON, R. Dietary fibre in triticale grain: variation in content, composition and molecular weight distribution of extractable components. In:

Journal of Cereal Science. 2011, vol. 54(3), pp. 324-331. ISSN 0733-5210. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.06.010.
271. RAKOCZYTROJANOWSKA, M. The effect of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. In: *Cellular and Molecular Biology (CMB)*. 2002, nr 7, pp. 1111-1120. ISSN 1939-4586 (online).
272. RAMULIFHO, E., GOCHE, T., AS, V. Establishment and characterization of callus and cell suspension cultures of selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench Varieties: A Resource for Gene Discovery in Plant Stress Biology. In: *Agronomy*. 2019, vol. 9. ISSN 2073-4395. DOI: 10.3390/agronomy9050218.
273. RANDHAWA, H., BONA, L., Graf, R. Triticale breeding – progress and prospect. In: *Triticale*. Editor: F. EUDES. New York: Springer, 2015, chapter 2, pp 15-32. ISBN 978-3-319-22550-0. DOI:10.1007/978-3-319-22551-7_2.
274. RANOLIYA, P., BHATIYA, V., TALPADA, M., KULKARNI, G. Genetic variability for quantitative characters under different sowing condition in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *AGRES - An Internationale - Journal*. 2017, vol. 6(1), pp. 88-104. ISSN, ISSN 2277-9663.
275. RAO, S., RAMGOPAL, S. Effect of *Alternaria helianthi* culture filtrate on callus and regeneration of plantlets from tolerant callus in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Indian Journal of Biotechnology*. 2010, vol. 9, pp. 187-191. ISSN 0975-0967 (online) Disponibil: http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7798.
276. RAO, V.R., HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002, vol. 68(1), pp. 1-19. ISSN 1573-5044 (online).
277. RASTOGI, J., SIDDHANT, BUBBER P., SHARMA, B. Somaclonal variation: a new dimension for sugarcane improvement. In: *GERF Bulletin of Biosciences*. 2015, vol. 6(1), pp. 5-10. ISSN 2229-6433.
278. RIAZ, A., GUL, A. Plant mutagenesis and crop improvement. In: *Crop Production and Global Environmental Issues*. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 181-209. ISBN 978-3319231631. DOI:10.1007/978-3-319-23162-4_8.
279. RIKIISHI, K., MATSUURA, T., MAEKAWA, M., TAKEDA K. Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. In: *Breeding Science*. 2008, vol. 58(2), pp. 129-135. ISSN 1347-3735 (online).
280. RIVIELLO-FLORES, M., CADENA-IÑIGUEZ, J., RUIZ-POSADAS, L., ARÉVALO-GALARZA, M., CASTILLO-JUÁREZ, I., SOTO HERNÁNDEZ, M., CASTILLO-MARTÍNEZ, C. Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties. In: *Plants (Basel)*. 2022, vol. 11(9), p. 1161. ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants11091161.
281. RIVAL, A. Variations in genomic DNA methylation during the long - term *in vitro* proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. In: *Plant Cell Rep*, 2013, vol. 32, pp. 359–368. ISSN 0721-7714.
https://doi.org/10. 1007/s00299-012-1369-y.
282. ROGHAYEH, Ah., NASSER Z., ASGHARI-ZAKARTA, R., SHEIKHZADEH, P. Efficient *in vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from mature and immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2016, vol. 59. e160288. ISSN 1516-8913.
https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160288.
283. ROY, B., KUMAR, V., TULSIRAM, S., DAS, B. Development of high yielding aromatic mutants of rice (*Oryza sativa* L.) from a local aromatic cultivar, Tulaipanji by

using gamma radiation. In: *Indian Journal of Genetics*. 2018, vol. 78, pp. 409-416. ISSN 0022-1333 (print).
284. ROYANI, J., SUDARSONO, I., ABDULLAH, L., AISYAH. S. Radio - sensitivity of irradiated seed, plantlets, callus, and *in vitro* leaves from *Indigofera zollingeriana* Miq by gamma rays. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021, vol. 913, 012061. DOI:10.1088/1755-1315/913/1/012061.
285. SAHOO, S., JHA, Z., VERULKAR, S., SRIVASTAVA, A., SUPRASANNA, P. High - throughput cell analysis based protocol for ploidy determination in anther - derived rice callus. In: *Plant Cell Tissue Organ Cult*., 2019, vol. 137, pp. 187–192. ISSN 1573-5044 (Online).
286. SALUNKE, M., RATHOD, B., DATTAGONDE, N. *In vitro* regeneration of oat (*Avena sativa* L.) using different explants. In: *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017, vol. 6(12), pp. 434-440. ISSN 2319-7706. DOI:https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.05.
287. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001, vol. 2. ISBN 0-87969-576-5; ISBN 0-87969-577-3.
288. SAO, R., SAHU, P., PATEL, R., DAS, B., JANKULOSKI, L., SHARMA, D. Genetic improvement in plant architecture, maturity duration and agronomic traits of three traditional rice landraces through gamma ray - based induced mutagenesis. In: *Plants*. 2022, vol. 11, p. 3448. ISSN 2223-7747.
https://doi.org/10.3390/ plants11243448.
289. SAPKOTA, S., ZHANG, Q., CHITTEM, K. et al. Evaluation of triticale accessions for resistance to wheat bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. In: *Plant Pathology*. 2018, vol. 67(3), pp. 595-602. ISSN 1365-3059 (online). https://doi.org/10.1111 /ppa.12768.
290. SAPKOTA, S. *Identification and genomic mapping of resistance to bacterial leaf streak in wheat*: master of science. Fargo, North Dakota, 2015, 94 p.
291. SARALA, K., VENKATESWARLU, P., MURTHY, T. Development of tobacco somaclones from leaf curl virus infected leaves and their characterization. In: *Tobacco Research*. 2013, vol. 39, pp. 41-48. ISSN 0379 - 055X.
292. SELDIMIROVA, O., KUDOYAROVA, G., KRUGLOVA, N. Changes in distribution of zeatin and indolyl – 3 - acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016 a, vol. 52, pp. 251– 264. ISSN 1054-5476 (print). DOI: 10.1007/s11627-016-9767-4.
293. SEMAGN, K., BJØRNSTAD, A., NDJIONDJOP, M. An overview of molecular marker methods for plants. In: *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5(25), pp. 2540-2568. ISSN 1684-5315.
294. ERRANO-FUENTES, M., GÓMEZ-MERINO, F., CRUZ-IZQUIERDO, S., SPINOSO-CASTILLO, J., BELLO-BELLO, J. Gamma radiation (^{60}Co) induces mutation during *in vitro* multiplication of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). In: *Horticulturae*. 2022, vol. 8, p. 503. ISSN 2311-7524
https://doi.org/10.3390/h orticulturae8060503.
295. SHAHIN, E., SPIVEY, R. Single dominant gene for fusarium wilt resistance in protoplast - derived tomato plants. In: *Theoretical and Applied Genetics*. 1986, vol. 73, pp. 164-169. ISSN 0040-5752 (print).
Disponibil: https://doi.org/10.1007/BF00289270.
296. SHAMSUZZAMAN, M., BHATTACHARJYA, D., ISLAM, M., HOQUE, M. Molecular diversity analysis of somaclonal variants of potato (*Solanum tuberosum* L.) by

random amplified polymorphic DNA markers. In: *Annual Research & Review in Biology*. 2021, vol. 36, pp. 63-76. ISSN 2347-565X.
297. SHARMA, V., THAKUR, M., TOMAR, M. *In vitro* selection of gamma irradiated shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) against *Fusarium oxysporum* f.sp. zingiberi and molecular analysis of the resistant plants. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2020, vol. 143, pp. 319-330. ISSN 1573-5044 (online).
298. SHARMA, V., HANSCH, R., MENDEL, R., SCHULZE, J. Mature embryo axis - based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Journal of Experimental Botany*. 2005, vol. 56(417), pp. 1913-1922. ISSN 0022-0957 (print).
299. SHARMA, O., NAMDEO, A., MAHADIK, K. Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. In: *Pharmacognosy Reviews*. 2008, vol. 2(3), pp. 23-34. ISSN 0976-2787 (online).
300. SHELTON, D., LEE, W. Cereal carbohydrates. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*. Edited: K. KULP AND J.G. PONTE. 2nd Ed. New York, 2000, pp. 385-415. ISBN 9780824782948.
301. SHUKLA, S., BHARGAVA, A., CHATTERJEE, A., SINGH, S. Estimates of genetic parameters to determine variability for foliage yield and its different quantitative and qualitative traits in vegetable amaranth (A. tricolor). In: *Journal of Genetics and Breeding*. 2004, vol. 58(2), pp. 169-176.ISSN 1212-1975 (print), ISSN 1805-9325 (online).
302. SHYAM, C., TRIPATHI, M., TIWARI, S., TRIPATHI, N., SOLANKI, R., SAPRE, S., AHUJA, A., TIWARI, S. *In vitro* production of somaclones with decreased erucic acid content in Indian mustard [*Brassica juncea* (Linn.) Czern&Coss]. In: *Plants*. 2021, nr 10, p. 1297. Disponibil: https://doi.org/10.3390/plants10071297.
303. SIAMAK, S., JAIN, S. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. In: *Plants*. 2020, vol. 9(6), p. 702.ISSN 2223-7747.
304. SILVA, da T.C.R., CARVALHO, C. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. In: *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*. 2014, vol. 50(2), pp. 158-165. ISSN 1054-5476. DOI: 10.1007/s11627-013-9582-0.
305. SINGH, R., CHAUDHARY, B. *Biometrical Methods in Quantitative Analysis. Kalayani Publishers*. New Delhi, 1985. 304 p. ISBN 978-8176633079.
306. SONG, J., KIM, D., LEE, M., LEE, K., KIM, J., KIM, S. et al. Physiological characterization of gamma - ray induced salt tolerant rice mutants. In: *Australian Journal of Crop Science*. 2012, vol. 6, pp. 421-429. ISSN 1835-2707.
307. SPENCER-LOPES, M., FORSTER, B., JANKULOSKI, L. *Manual on Mutation Breeding*: Plant breeding and genetics subprogramme joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture Vienna, Austria.3rd ed. Rome, Italy, 2018, 301 p. Disponibil: file:///E:/moi%20document/Downloads/Garmmarays.pdf.
308. SPINOSO-CASTILLO, J., ESCAMILLA-PRADO, E., AGUILAR-RINCÓN, C., MORALES-RAMOS, V., GARCÍA-DE LOS SANTOS, G., CORONA-TORRES, T. Physiological response of seeds of three coffee varieties to gamma rays (^{60}Co). In: *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 2021, vol. 27, pp. 101-112. ISSN 1027-152X (print).
309. STACE, C. Triticale: A Case of nomenclatural mistreatment. In: *Taxon*. 1987, vol. 36(2), pp. 445-452. ISSN 1996-8175 (online). DOI:10.2307/1221447, JSTOR1221447.
310. STALLKNECHT, G., GILBERTSON, K., RANNEY, J. Alternative wheat cereals as food grains: einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. In: *Progress in new crops*.

Indiana edited by J. JANICK. Alexandria, VA (USA): ASHS Press, 1996, pp. 156-170. ISBN 09-615-02738.
311. STANIŠIĆ, M., RASPOR, M., NINKOVIĆ, S., MILOŠEVIĆ, S., ĆALIĆ, D., BOHANEC, B., TRIFUNOVIĆA, M., PETRIĆA, M., SUBOTIĆ, A., JEVREMOVIĆ, S. Clonal fidelity of Iris sibirica plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf - base culture - RAPD and flow cytometer analyses. In: *South African Journal of Botany*. 2015, vol. 96, pp. 42-52. ISSN 0254-6299.
312. SUHARTANTO, B., ASTUTIK, M., UMAMI, N., SUSENO, N., HAQ, M. The effect of explants and light conditions on callus induction of srikandiputih maize (*Zea mays* L.) In: *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2022, vol. 1001: 1st International Conference on Animal Research for Eco-Friendly Livestock Industry 23/11/2021 - 23/11/2021 Online. 012006. ISSN 1755-1315(online). DOI:10.1088/1755-1315/1001/1/012006.
313. SUN, S., ZHONG, J., LI, S., WANG, X. Tissue culture - induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). In: *Botanical Studies*. 2013, vol. 54(1), p. 36. ISSN 1817-406X. DOI:10.1186/1999-3110-54-36.
314. SUPRASANNA, P., JAIN, S., OCHATT, S., KULKARNI, V., PREDIERI, S. Applications of *in vitro* techniques in mutation breeding of vegetatively propagated crops. In: *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Editors: Q.Y. SHU, B.P. FORSTER, H. NAKAGAWA. CAB International, Wallingford (UK), 2012, pp. 369-383. ISBN 978-1-78064-085-3.
315. SUPRASANNA, P., VITTHAL, S., YADAV, P. *In vitro* mutagenesis and selection in plant tissue cultures and their prospects for crop improvement. In: *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2012, vol. 6, pp. 6-14. ISSN 1749-0596 (print).
316. SUPRASANNA, P., MIRAJKAR, S., BHAGWAT, S. Induced mutations and crop improvement. In: *Plant Biology and Biotechnology*. Editors: B. BAHADUR, M.V.RAJAM, L. SAHIJRAM, K.V. KRISHNAMURTHY. Springer, 2015, pp. 593-618.
317. SURAKSHITHA, N., SOORIANATHASUNDARAM, K. Determination of mutagenic sensitivity of hardwood cuttings of grapes 'Red Globe'and 'Muscat' (*Vitis vinifera* L.) to gamma rays. In: *Scientia Horticulturae*. 2017, vol. 226, pp. 152-156. ISSN 0304-4238.
318. SURYA, M., ISMAINI, L., LAILATY, I. *In vitro* regeneration and induction of mutation in loquat (*Eriobotrya japonica* L.). In: *Australian Journal of Crop Science*. 2019, vol. 13, p. 701. ISSN. 1835-2707.
319. SZUĆKO, I. Application of ITAP - PCR techniques to assess the genetic variability of selected cultivars of winter triticale (×*Triticosecale* Wittmack). In: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*. Cluj-Napoca, 2019, 47(3), pp. 947-953. ISSN 1842-4309 (online). DOI:10.15835/nbha47311494.
320. TAMIMI, S. and OTHMAN, H. Callus induction and regeneration from germinating mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Sains Malaysiana*. 2021, vol. 50(4), pp. 889-896. ISSN 0126-6039. http://ddoi.org/10.17576/jsm-2021-5004-01.
321. TAWAR, P., SAWANT, R., SUSHIR, K., DEVARUMATH, R., HAPASE, R., METI, N. VSI 434: New sugarcane variety obtained through somaclonal variation. In: *Agricultural Research*. 2016, nr 5, pp. 127-136. ISSN: 2395-1435 (print).
322. THAKUR, M., SHARMA, D., SHARMA, S. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus cayophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* F. sp. dianthi. In: *Plant Cell Reports*. 2002, vol. 20, pp. 825-828. ISSN 0721-7714. Disponibil: https://doi.org/10.1007/s00299- 001-0412-1.
323. THOMAS, E. Biotechnology applications of plant callus cultures. In: *Engineering*. 2019, vol. 5(1), pp. 50-59. ISSN 2095-8099.

324. TICAN, A., CÂMPEANU, G., CHIRU, N., IVANOVICI, D. Using of unconventional methods for obtaining somaclonal variations, having as goal making of new potato varieties with resistance at diseases and pests. In: *Romanian Biotechnological Letters*. 2008, vol. 13, pp. 3791-3798. ISSN 1224-5984.
325. TOMASZEWSKA-SOWA, M., KEUTGEN, A. Plant regeneration from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) on growing media with different carbohydrates. In: *Sugar Technology*. 2021, vol. 24, pp. 1-9. ISSN 0974-0740 (online).
326. TONK, F., TOUSN, M., ILKER, E., ISTIPLILER, D., TATAR, O. Evalutaion and comparison of ISSR and RAPD markers for assessment of genetic diversity in triticale genotypes. In: *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2014, vol. 20(6), pp. 1413-1420. ISSN 1310-0351.
327. UDOMCHALOTHORN, T., PLAIMAS, K., COMAI, L., BUABOOCHA, T., CHADCHAWAN, S. Molecular karyotyping and exome analysis of salt - tolerant rice mutant from somaclonal variation. In: *The Plant Genome*. 2014, vol. 7(3), pp. 1-11. ISSN 1940-3372 (online).
328. ULLAH, N., ULLAH, H., AFRIDI, K., ALAM, M., JADOON, S., KHAN, W., AHMAD, M., UDDIN, H. Genetic variability, heritability and correlation analysis among morphological and yield traits in wheat advanced lines. In: *Biological Diversity and Conservation*. 2018, vol. 11(1), pp. 166-180. ISSN 1572-9710 (online).
329. UPADHYAY, K., ADHIKARI, N., GBKC, SHARMA, S. Genetic variability and cluster analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in foot hill of Nepal. In: *Archives of Agriculture and Environmental Science*. 2019, vol. 4(3), pp. 350- 355. ISSN 2456-6632 (online).
330. VIANA, V., PEGORARO, C., BUSANELLO, C. and COSTA DE OLIVEIRA, A. Mutagenesis in rice: the basis for breeding a new super plant. In: *Frontiers in Plant Science*, 2019, vol. 10.p.1326. ISSN 1664-462X (online).
331. VYROUBALOVÁ, Š., ŠMEHILOVÁ, M., GALUSZKA, P. and OHNOUTKOVÁ, L. Genetic transformation of barley: limiting factors. In: *Biologia Plantarumum*. 2011, vol. 55(2), pp. 213-224. ISSN 0006-3134 (print).
332. WASIFA, N., LONE, R., KAMILI, A., HUSAINI, A. Callus induction and regeneration in high - altitude Himalayan rice genotype SR4 via seed explants. In: *Biotechnology Reports*. 2022, vol. 36, e00762. ISSN 2215-017X. https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00762.
333. WHEELER, T., KECECIOGLU, J. Multiple alignment by aligning alignments. In: *Bioinformatics*. 2007, vol. 23(13), pp. 559-568. ISSN 1367-4803 (print).
334. WEBER, D., HELENTJARIS, T. Mapping RFLP loci in maize using B - A translocations. In: *Genetics*. 1989, vol. 121(3), pp. 583-590. ISSN 0016-6731.
335. WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., MEYER, W. Applications of DNA fingerprinting in plants and fungi. In: *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press Inc, 1995, 322 p. ISBN 9780849389207.
336. WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. In: *Nucleic Acids Research*. 1990, vol. 18(24), pp. 7213-7218. ISSN 1362-4962.
337. WILSON, S. Wheat and rye hybrids. In: *Transactions and Proceedings of the Botanical Society of Edinburgh*. 1873, vol. 12, pp. 286-288.
338. YADAV, T., KOTHARI, S. and KACHHWAHA, S. Evaluation of regeneration potential of mature embryo derived callus in Indian cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2011, vol. 20(2), pp. 166-172. ISSN 0974-1275.
339. YAYCILI, O., ALIKAMANOĞLU, S. Induction of salt - tolerant potato (*Solanum tuberosum* L.) mutants with gamma irradiation and characterization of genetic variations

via RAPD - PCR analysis. In: *Turkish Journal of Biology*. 2012, vol. 36, pp. 405-412. ISSN 1300-0152.
340. YIN, G., WANG, Y., SHE, M., DU, L., XU, H., MA, J., YE, X. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat. In: *Agricultural Sciences in China*. 2011, vol. 10(1), pp. 9-17. ISSN 1671-2927.
341. YU, H., WANG, W., WANG, Y., HOU, B. High frequency wheat regeneration from leaf tissue explants of regenerated plantlets. In: *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012, vol. 3, pp. 46-50. ISSN 2156-8502. DOI: 10.4236/abb.2012.31008.
342. YU, Y., WANG, J., ZHU, M., WEI, Z. Optimization of mature embryo - based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. In: *Plant Breeding*. 2008, vol. 127, pp. 249-255. ISSN 14390523. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01461.x.
343. YUNIA, E. B., INDRIYANI, S., WIDORETNO, W. The effect of gamma irradiation on the growth and multiplication of the *in vitro* shoot of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). In: *Journal of Experimental Life Science*. 2020, vol. 10(2). ISSN 2087-2852, E-ISSN 2338-1655.
344. ZADOKS, J., CHANG, T., KONZAK, C. A decimal code for the growth stages of cereals. In: *Weed Research*. 1974, vol. 14, pp. 415-421. ISSN 1365-3180 (online). https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.
345. ZHANG, D., WANG, Z., WANG, N., GAO, Y., LIU, Y. et al. Tissue culture - induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications. In: *PLOS ONE*. 2014, vol. 9(5), e96879. Published: May 7, 2014. ISSN 1932-6203. Disponibil: https://doi.org/10.1371 /journal.pone.0096879.
346. ZHANG, Y., XU, Z., XIE, T., ZHANG, W., HE, Y., LIU, C. *In vitro* selection and identification of a cold - tolerant variant in pineapple (*Ananas comosus*). In: *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2022, vol. 63, pp. 275-286. ISSN 2211-3460 (online).
347. ZHAO, X., YU, S., WANG, Y., JIANG, D., ZHANG, Y., HU, L., ZHU, Y. Field performance of disease - free plants of ginger produced by tissue culture and agronomic, cytological, and molecular characterization of the morphological variants. In: *Agronomy*. 2023, nr 13, p. 74. ISSN 2073-4395. Disponibil: https://doi.org/10.3390/agronomy 13010074.
348. ZIAUDDIN, A., KASHA, K. Long - term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. In: *Euphytica*. 1990, vol. 48(3), pp. 279-286. ISSN 15735060.
349. ZIEMIENOWICZ, A., SHIM, Y., MATSUOKA, A., EUDES, F. and KOVALCHUK, I. A novel method of transgene delivery into triticale plants using the *Agrobacterium* transferred DNA - derived nano - complex. In: *Plant Physiology*. 2012, vol. 158(4), pp. 1503-1513. ISSN 1532-2548 (online). DOI.org/10.1104/ pp.111.192856.
350. ZIMNY, J. and BEDNAREK, P. Tissue culture - induced genetic and epigenetic variation in triticale (*Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. In: *Plant Molecular Biology*. 2015, vol. 89(3), pp. 279-292. ISSN15735028.
351. ZULFIQAR, S., ISHFAQ, S., IKRAM, M., NAWAZ, M., RAHMAN, M. Characterization of gamma – rays – induced spring wheat mutants for morphological and quality traits through multivariate and GT Bi - Plot analysis. In: *Agronomy*. 2021, vol. 11(11), p. 2288. ISSN 2073-4395. https://doi.org/10.3390/agronomy11112288.

Surse în limba rusă

352. БАЕР, Г., ЕМЕЦ, А., СТАДНИЧУК, Н. и др. Сомаклональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. В: *Цитология и генетика*. 2007, № 4, с. 9-14. ISSN 0564-3783.
353. БИШИМБАЕВА, Н. Сомаклональная вариабельность как источник получения новых форм пшеницы с ценными признаками. В: *Вестник Каз НУ. Сер. биологическая*. 2012, т. 55, № 3, с. 41-46. ISSN 1563-0218.
Disponibil: file: ///E:/m oi%20document/Downloads/250.pdf.
354. ГВАСАЛИЯ, М.В Сомаклональная вариабельность *in vitro* – источник для создания новых сортов растений. Глава 4: Биотехнология растений. В: *Субтропическое и декоративное садоводство*. 2018, вып. 66, с. 113-120. ISSN 2225-3068. DOI: 10.31360/2225-3068-2018-66-113-120.
Disponibil:http://journal.vniisubtrop.ru/upload/ec/ab4/ab404f88d824c2e681cd911ca8e4bd8d.pdf.
355. ГВАСАЛИЯ, М. Сохранение уникальных сортов растений чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) методами биотехнологии. В: *Субтропическое и декоративное садоводство*. 2016, вып. 59, с. 100-106. ISSN 2225-3068.
356. ДОЛГИХ, Ю., ОСИПОВА, Е., СОЛОВЬЕВА, А. и др. Влияние стрессов на генетическую изменчивость культивируемых тканей растений. В: *Биология клеток растений in vitro и биотехнология*: сборник тез. 10-й междунар. конф., Казань, 14-18 окт. 2013. Казань, 2013, с. 64. ISBN: 978-5-93962-626-2.
357. ДОЛГИХ, Ю. *Сомаклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы)*:автореф. дис. на соиск. уч. степ. докт. биол. наук. Москва, 2005, 45 с.
358. ЕМЦЕВА, М. Использование генов *Vrn* для создания форм тритикале с разной продолжительностью вегетационного периода: (обзор). В: *Сельскохозяйственная биология*. 2020, т. 55, № 1, с. 3-14. ISSN 2313-4836.
DOI:10.15389/agrobiology. 2020.1.3rus.
359. ЕРЕМЕНКО, Л. *Продуктивность и качество зерна сомаклональных линий и биотипов яровой мягкой пшеницы*: автореф. дисс. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. Саратов, 2002, 24 с.
360. ЕРЕЩЕНКО, О., ХЛЕБОВА, Л. Клеточная селекция яровой твердой пшеницы на устойчивость к дефициту влаги. В: *Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности*: материалы 8-й всероссийской науч.- практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием. г Бийск, 2015, Бийск с. 232-236.
361. ЕРЕЩЕНКО, О., НИКИТИНА, Е., ХЛЕБОВА, Л. Оценка эффективности различных схем клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к осмотическим стрессам. В: *Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности*: материалы 7-й всероссийской науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием, 21-23 мая 2014 , г. Бийск. Бийск, 2014, с. 220-224.
362. ЗАУШИНЦЕНА, А., БЕРЕЗИН, В. Оценка эффективности образования каллуса у тимофеевки луговой на селективных средах. В: *Вестник Кемеровского государственного университета*. 2015, т. 4, № 1(61), с. 7-10. ISSN 2078-8975.
363. ЗИНАТУЛЛИНА, А. Модельная система „зародыш – зародышевый каллус” для экспресс – оценки стрессовых и антистрессовых воздействий (на примере злаков). В: *Экобиотех*, 2020, т. 3, № 1, С. 38-50. ISSN 2618-964X.

364. КОСТИНА, Е., ЛОБАЧЕВ, Ю., ТКАЧЕНКО, О. Андрогенез в культуре пыльников *in vitro* генетически маркированных линий подсолнечника. В: *Современные проблемы науки и образования*. 2015, № 3, с. 613. ISSN 2070-7428.
365. КОТЕЛНИКОВА, Л., БУЮКЛИ, П., ВЕВЕРИЦЭ, Е. Создание нового исходного материала в селекции тритикале. В: *Генетика и селекция тритикале в Молдове*. Кишинев: Штиинца, 1992, с. 5-23.
366. КРУГЛОВА, Н. Каллус как модель для изучения формирования структуры высшего растения. В*: ИзвестияУфимского научного центра РАН*. 2011, № 3,с. 17-22. ISSN 2222-8349.
367. КРУГЛОВА, Н., КАТАСОНОВА, А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант. В: *Физиология и биохимия культурных растений.* 2009, т. 41, № 2,с. 124-131. ISSN 0522-9310 (Print).
368. КРУГЛОВА, Н., ТИТОВА, Г., СЕЛЬДИМИРОВА, О. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков. В: *Онтогенез.* 2018, т. 49, № 5,с. 273-288. DOI: 10.1134/S0475145018050038. ISSN 0475-1450 (Print).
369. КРУГЛОВА, Н., СЕЛЬДИМИРОВА, О., ЗИНАТУЛЛИНА, А. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений. В: *Известия Уфимского научного центра РАН.* 2019, № 2, с. 44-54. ISSN 2222-8349.
370. КУНАХ, В. Эволюция клеточных популяций *in vitro*: особенности, механизмы, движущие силы и следствия. В: *Биология клеток растений in vitro и биотехнология:* 10-я междунар. конф., Казань, Россия, 14-18 окт. 2013 г. Казань, 2013, с. 47. ISBN 978-5-93962-626-2.
371. ЛЕБЕДЕВ, В., АЗАРОВА, А., ШЕСТИБРАТОВ, К., ДЕМЕНКО, В. Проявление сомаклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений. В: *Известия ТСХА*. 2012, вып. 1, с. 153-163. ISSN 0021-342X.
372. ЛЯТАМБОРГ, С., РОТАРЬ, С., ГОРЕ, А. Характеристика линий озимой тритикале по хозяйственно ценным признакам. В: *Агрофизический институт : 90 лет на службе земледелия и растениеводства* : междунар. научн. конф., Санкт-Петербург, 14-15 апр. 2022 г. С.-Пб., 2022, с. 368-372. ISBN 978-5-505-200-48-9.
373. МИРОШНИЧЕНКО, Т., ИВЧЕНКО, Т., САМОВОЛ, А. Особенности длительного культивирования пробирочных растений отдаленных гибридов томата. В: *Овощи России*. 2015, № 1, с. 20-26. ISSN 2072-9146. Disponibil: https://doi.org/10.18619/2072-9146-2015-1-20-26.
374. НИКИТИНА, Е., ХЛЕБОВА, Л., СОКОЛОВА Г. Создание источников устойчивости яровой пшеницы к воздействию никеля методами клеточной селекции *in vitro*. В: *Известия Алтайского государственного университета*. 2013, № 3-1 (79), с. 88-90. ISSN 1561-9451.
375. НИКИТИНА, Е. Создание стрессоустойчивого материала яровой мягкой пшеницы с использованием клеточной селекции *in vitro*. В: *Известия Алтайского государственного университета*. 2013, № 3-2 (79), с. 95-98. ISSN 1561-9451.
376. НИКИТИНА, Е., ХЛЕБОВА, Л., ПРОНИНА, Р. Сомаклональная изменчивость *in vitro* как источник создания исходного материала для селекции мягкой пшеницы. В: *Acta Biologica Sibirica*. 2015, nr 3-4, pp. 171-185. ISSN 2412-1908 (online). Disponibil:https://www.researchgate.net/publication/301925572_IN_VITRO_SOMACLONAL_VARIATION_AS_INITIAL_MATERIAL_FOR_BREAD_WHEAT_BREEDING.
377. ПАУШЕВА, З. Практикум по цитологии растений. Изд. 4-е. Москва. 1988. 272 с. ISBN 5-10-000614-5.

378. ТАНАСИЕНКО, И., ЕМЕЦ, А., БЛЮМ, Я. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории. В: *Цитология и генетика*. 2009, № 4, с. 12-19. ISSN 0564-3783 (print).
379. ТИХОМИРОВА, В. Теория и практика управления. Продовольственная безопасность: сущность понятия. В: *Вестник РЭУ им. Г. В. Плеханова* , 2015, № 6, с. 84. ISSN 2413-2829 (print).
380. ХЛЕБОВА, Л., НИКИТИНА, Е., МАЦЮРА, А., БЫЧКОВА, О. Взаимосвязь морфогенетических процессов в культуре ткани пшеницы. In: *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnitskiy Melitopol State Pedagogical University*. 2016, Т. 6 (2), с. 311 – 320. eISSN 2225 – 5486.

ANEXE

Anexa 1. Inducerea embriogenezei somatice și particularitățile regenerării indirecte din embrioni maturi la triticale

Genotip	Nr. de explante inoculate	Calus embriogen		Calus embriogen regenerativ		Capacitatea de regenerare și înrădăcinare, lăstari				Plante aclimatizate	
		total	%	total	%	total	transf. mediu înrad.	înră-dăci-nați	%	total	%
Ingen 33	30	20	66,66	8	40	13	7	5	71,43	4	80
	30	18	60	10	55,55	9	7	6	85,71	3	50
	30	17	56,66	5	29,41	5	5	3	60,00	2	66,66
Ingen 35	30	18	60	7	38,88	8	6	5	83,33	4	80
	30	20	66,66	8	40	9	5	4	80,00	3	75
	30	21	70	5	23,80	7	5	2	40,00	0	0
Ingen 93	30	17	56,66	5	29,41	6	5	4	80,00	3	75
	30	16	53,33	4	25	6	7	3	42,86	1	33,33
	30	15	50	5	33,33	7	-	-	-	-	-
Colina	30	22	73,33	9	40,90	11	8	6	75,00	4	60
	30	22	73,33	9	40,90	10	8	6	75,00	5	83,33
	30	20	66,66	8	35	9	5	4	80,00	3	75
188TR	30	18	60	6	33,33	8	6	5	83,33	3	60
5021	30	20	66,66	6	30	7	4	2	50,00	1	50
	30	18	60	6	33,33	8	5	3	60,00	1	33,33
LT 76872	30	16	53,33	3	18,75	3	2	1	50,00	0	0
	30	13	43,33	2	23,07	3	1	1	100,0	1	100
	30	10	33,33	1	10	-	-	-	-	-	-
Rodlen	30	19	63,33	3	15,78	-	-	-	-	-	-
	30	16	53,33	4	25	5	4	2	50,00	2	10
	30	16	53,33	3	15,78	4	2	2	100,0	1	50
CAD	30	25	83,33	10	40	14	9	7	77,78	5	71,42
2/917	30	24	80	11	45,83	15	10	9	90,00	7	77,77
	30	25	83,33	11	44	12	7	6	85,71	5	83,33

Anexa 2. Analiza variaţiei masei calusului cu diferite doze de iradiere

Doza de iradiere gama, Gy	Masa medie, mg							
	Ingen 33	Ingen 35	Ingen 93	Colina	188TR5021	LT 76872	Rodlen	CAD 2/917
	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %	$\bar{x}$±ES CV, %
M	709,03±36,11 8,82	814,08±26,95 5,73	658,42±24,74 6,51	520,78±32,46 10,79	400,79±1,42 0,61	384,38±8,26 3,72	472,23±14,46 5,30	691,32±8,19 2,05
50	641,15±23,96 6,47	788,05±6,53 1,43	615,97±4,36 1,22	471,55±37,27 13,69	302,08±12,69 7,27 **	310,65±5,31 2,96 **	344,12±19,64 9,88 **	650,04±11,58 3,08
75	662,34±28,92 7,56	793,12±42,20 9,21	622,55±25,41 7,07	482,01±41,05 14,75	344,70±22,01 11,06	313,33±19,37 10,71 *	356,07±23,75 11,55 *	682,41±40,27 10,22
100	708,54±2,96 0,72	809,22±3,64 0,77	651,54±6,66 1,77	491,18±26,65 9,40	358,41±24,41 11,79	317,51±30,12 16,48	364,12±23,64 11,24 *	712,44±3,83 0,93
125	714,11±8,13 1,97	823,12±12,47 2,62	640,76±23,88 6,45	519,66±16,02 5,33	360,73±24,77 11,89	337,90±5,78 2,96 **	403,79±21,34 9,15	749,18±25,55 5,90
150	745,08±19,61 4,55	879,57±15,65 3,08	681.07±32,37 8,22	615,07±51,65 14,54	399,00±10,12 4,39	395,40±26,60 11,65	507,11±9,70 3,31	777,31±23,13 5,15 *
200	698,32±10,89 2,70	754,58±14,36 3,29	602,33±32,91 9,46	423,21±19,17 7,84	315,76±23,93 13,13*	281,33±35,52 21,87 *	322,34±15,53 8,34 **	640,10±13,63 3,68 *

Notă: $\bar{x}$ − media, ES – eroarea standard, CV,% - coeficientul de variație, * și ** - semnificative pentru P≤0,05 și 0,01.

Anexa 3. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţie gama asupra frecvenţei morfogenezei

Doza gama, Gy	Genotipul							
	Ingen 33	Ingen 35	Ingen 93	Colina	188TR5021	LT 76872	Rodlen	CAD 2/917
	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES	$\bar{x}$±ES
M	44,55±1,81	32,19±2,79	30,25±0,86	35,33±1,30	30,22±1,88	17,25±0,80	19,75±2,43	46,90±0,58
50	45,35±1,38	32,43±1,90	30,86±0,86	32,73±0,08	26,07±1,78 **	16,38±2,06	15,35±1,61	47,04±2,63
75	46,56±2,65	33,05±3,47	35,22±3,53	33,00±0,75	24,58±1,23 **	15,62±0,75	15,78±0,11	48,25±1,96
100	48,19±0,15	34,49±1,21	35,55±1,45 **	35,55±1,45	22,00±2,73 ***	15,19±1,57	16,11±0,97	48,99±1,39
125	49,22±1,05	33,99±2,20	37,42±1,16 **	34,61±2,63	22,22±1,58 ***	14,55±0,99	17,54±1,85	51,07±0,83 **
150	49,46±2,35 **	34,00±1,00	42,14±1,15 ***	35,02±2,02	22,45±0,60 ***	14,23±2,43	19,00±3,02	52,57±0,67 ***
200	21,11±1,05 ***	21,99±0,50 **	19,45±1,48 ***	25,22±3,33 **	10,01±0,95 ***	8,27±0,78 ***	9,99±0,67 **	24,15±1,92 ***
250	11,22±0,85 ***	10,15±0,13 ***	12,44±1,05 ***	18,62±2,03 ***	9,22±0,93 ***	5,99±1,54 ***	8,44±2,05 **	12,88±1,74 ***

Notă: $\bar{x}$ − media, ES – eroarea standard, ** și *** - diferențe semnificative pentru P≤0,01; 0,001.

Anexa 4. Variația caracterelor biomorfologice ale somaclonelor SC_1 de triticale

Caracter / Genotip	Numărul de fraţi fertili	Talia plantei, cm	Lungimea spicului principal, cm	Lungimea ultimului internod	Numărul de boabe/spic	Greutatea boabelor, g	Masa a 1000 boabe, g
	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%	$\bar{x}$ ± ES CV,%
Martor Ingen 35	1,06±0,11 59,97	89,06±1,08 6,66	11,21±0,18 9,26	24,53±0,66 14,78	23,73±2,42 56,00	0,95±0,10 59,06	39,70±1,23 15,53
RAD Ingen 35	0,76±0,16 109,29	**80,18±1,62***** **10,13**	11,4±0,22 9,96	23,42±0,52 11,25	**13,08±2,26**** **86,71**	**0,44±0,09**** **92,07**	24,88±2,70***** 54,42
In vitro Ingen 35	0,92±0,17 93,71	**101,4±1,39***** **6,86**	**12,7±0,2***** **7,87**	**27,3±0,48**** **8,83**	17,32±2,44 70,64	0,70±0,12 87,44	34,22±3,70 54,15
Martor Ingen 93	1,44±0,11 39,97	102,5±1,58 8,04	11,31±0,16 7,76	28,92±0,71 12,87	38,0±3,49 47,84	1,45±0,13 48,20	38,69±1,12 14,59
RAD Ingen 93	1,36±0,13 52,56	101,8±2,50 13,45	**12,4±0,19***** **8,46**	**31,51±0,58**** **10,22**	32,36±2,86 48,52	**1,14±0,11*** **55,26**	32,34±1,42** 22,07
In vitro Ingen 93	**1,18±0,09*** **40,78**	**116,33±2,50***** **11,19**	**12,37±0,34***** **14,39**	**34,07±0,64***** **9,84**	**47,11±2,17*** **24,00**	**1,85±0,11*** **31,47**	38,42±1,34 17,49
Martor 188TR5021	2,4±0,17 40,35%	115,4±0,96 4,57%	12,40±0,18 8,11%	41,38±0,65 8,72%	47,03±2,72 31,74%	1,20±0,08 36,41%	25,52±0,95 18,75%
RAD 188TR5021	**1,33±0,16*** **66,30**	**79,38±2,27***** **15,68**	**11,36±0,30*** **14,54**	**21,17±0,55***** **14,41**	**9,86±1,41***** **78,40**	**0,25±0,04***** **98,19**	21,15±2,21 52,42
In vitro 188TR5021	**0,5±0,10***** **114,47**	**89,31±1,32***** **8,09**	12,32±0,24 11,04	**27,54±0,53***** **10,60**	**20,86±2,14***** **56,19**	**0,77±0,09**** **65,34**	32,06±2,48* 38,74

Notă: $\bar{x}$ − media, ES – eroarea standard, CV,% - coeficientul de variație, *, **, *** - diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Anexa 5. Analiza varianţei indicilor biomorfologici la somaclonele SC_1 (testul ANOVA)

Sursa variației	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Numărul de frați fertili					
Genotipul	28,36	2	14,18	24,03***	**22,15**
RAD	8,64	1	8,64	14,64***	6,75
Interacțiunea Genotip - RAD	6,04	2	3,02	5,12**	4,71
Rezidual	84,96	144	0,59		
Total	128,0	149			
Genotipul	6,28	2	3,14	6,47**	4,93
Cultura *in vitro*	24,0	1	24,0	49,43***	18,84
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	27,16	2	13,58	27,97***	**21,32**
Rezidual	69,92	144	0,49		
Total	127,36	149			
Talia plantei					
Genotipul	7012,77	2	3506,39	39,18***	**26,84**
RAD	4339,51	1	4339,51	48,49***	16,67
Interacțiunea Genotip - RAD	1884,71	2	942,36	10,53***	7,21
Rezidual	12885,8	144	89,48		
Total	26122,8	149			
Genotipul	6624,4	2	3312,2	45,66***	**28,74**
Cultura *in vitro*	759,375	1	759,38	10,47***	3,29
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	5216,83	2	2608,41	35,96***	**45,32**
Rezidual	10444,8	144	72,53		
Total	23045,4	149			
Lungimea spicului principal					
Genotipul	13,44	2	6,72	4,74**	5,65
RAD	0,22	1	0,22	0,16	0,09
Interacțiunea Genotip - RAD	19,66	2	9,83	6,93**	8,27
Rezidual	204,29	144	1,42		
Total	237,62	149			
Genotipul	9,10	2	4,55	2,84*	3,27
Cultura *in vitro*	22,19	1	22,20	13,87***	7,98
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	16,34	2	8,17	5,11**	5,87
Rezidual	230,42	144	1,60		
Total	278,06	149			
Lungimea ultimului internod					
Genotipul	1520,93	2	760,47	68,76***	18,93
RAD	1574,64	1	1574,64	142,38***	19,60
Interacțiunea Genotip - RAD	3342,67	2	1671,33	151,13***	**41,62**
Rezidual	1592,52	144	11,06		
Total	8030,76	149			
Genotipul	1891,11	2	945,55	84,16***	**30,77**
Cultura *in vitro*	150,2	1	150,2	13,37***	2,44
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	2485,79	2	1242,9	110,62***	**40,45**
Rezidual	1617,89	144	11,24		
Total	6144,99	149			
Numărul de boabe per spic					
Genotipul	6103,96	2	3051,98	14,59***	11,0
RAD	12132,0	1	12132,0	57,98***	**21,87**
Interacțiunea Genotip - RAD	7098,17	2	3549,09	16,96***	12,79

Rezidual	30130,4	144	209,24		
Total	55464,5	149			
Genotipul	11178,5	2	5589,26	27,46***	**21,98**
Cultura *in vitro*	2297,13	1	2297,13	11,29***	4,51
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	8070,49	2	4035,25	19,83***	15,87
Rezidual	29305,4	144	203,51		
Total	50851,5	149			
Greutatea boabelor					
Genotipul	8,66	2	4,32	14,60***	12,78
RAD	13,862	1	13,86	46,87***	**20,52**
Interacțiunea Genotip - RAD	2,46	2	1,23	4,16**	3,64
Rezidual	42,59	144	0,30		
Total	67,55	149			
Genotipul	16,14	2	8,07	23,41***	**22,70**
Cultura *in vitro*	0,35	1	0,35	1,01	0,48
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	4,94	2	2,47	7,16***	6,94
Rezidual	49,65	144	0,34		
Total	71,08	149			
Masa a 1000 boabe					
Genotipul	3983,81	2	1991,91	26,54***	**21,79**
RAD	2717,74	1	2717,74	36,22***	14,87
Interacțiunea Genotip - RAD	769,09	2	384,54	5,12***	4,20
Rezidual	10805,7	144	75,04		
Total	18276,3	149			
Genotipul	2745,83	2	1372,92	12,95***	14,51
Cultura *in vitro*	2,64	1	2,64	0,02	0,01
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	907,26	2	453,63	4,28**	4,79
Rezidual	15265,6	144	106,01		
Total	18921,3	149			

Notă: * ,**, *** - diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Anexa 6. Analiza varianţei indicilor biomorfologici la somaclonele SC_2 (testul ANOVA)

Sursa variației	Suma pătratelor	Grad de libertate (GL)	Varianța (S^2)	Testul Fisher (F)	PI, %
Numărul de frați fertili					
Genotipul	1,21	2	0,61	0,96	1,25
RAD	1,13	1	1,13	1,78	1,16
Interacțiunea Genotip - RAD	3,29	2	1,65	2,61*	3,40
Rezidual	90,96	144	0,63		
Total	96,59	149			
Genotipul	5,56	2	2,78	4,25**	5,25
Cultura *in vitro*	4,51	1	4,51	6,89***	4,26
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	1,45	2	0,73	1,11	1,37
Rezidual	94,24	144	0,65		
Total	105,76	149			
Talia plantei					
Genotipul	1315,99	2	657,99	3,52*	4,02
RAD	21,81	1	21,81	0,12	0,06
Interacțiunea Genotip - RAD	4444,15	2	2222,08	11,90***	13,60
Rezidual	26891,0	144	186,74		
Total	32672,9	149			
Genotipul	374,61	2	187,31	1,83	2,19
Cultura *in vitro*	467,46	1	467,46	4,58*	2,73
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	1514,99	2	757,50	7,42***	8,87
Rezidual	14704,1	144	102,11		
Total	17061,1	149			
Lungimea spicului principal					
Genotipul	21,89	2	10,95	4,14**	4,34
RAD	14,60	1	14,60	5,53*	2,89
Interacțiunea Genotip - RAD	87,16	2	43,58	16,49***	17,28
Rezidual	380,47	144	2,64		
Total	504,12	149			
Genotipul	13,12	2	6,56	2,95*	2,68
Cultura *in vitro*	141,14	1	141,14	63,50***	28,88
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	14,31	2	7,15	3,22*	2,92
Rezidual	320,03	144	2,22		
Total	488,59	149			
Lungimea ultimului internod					
Genotipul	700,48	2	350,24	7,44***	8,13
RAD	106,18	1	106,18	2,26	1,23
Interacțiunea Genotip - RAD	1028,66	2	514,33	10,93***	11,94
Rezidual	6775,23	144	47,05		
Total	8610,55	149			
Genotipul	163,16	2	81,58	2,74*	3,61
Cultura *in vitro*	32,20	1	32,20	1,08	0,71
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	25,74	2	12,87	0,43	0,57

Rezidual	4293,66	144	29,81		
Total	4214,77	149			
Numărul de boabe per spic					
Genotipul	22328,3	2	11164,1	21,25***	14,58
RAD	6259,74	1	6259,74	11,92***	4,08
Interacțiunea Genotip - RAD	48899,6	2	24449,8	46,54***	31,93
Rezidual	75646,8	144	525,33		
Total	153134,0	149			
Genotipul	3143,56	2	1571,78	3,19*	3,94
Cultura *in vitro*	19,44	1	19,44	0,04	0,02
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	5641,48	2	2820,74	5,73**	7,07
Rezidual	70931,3	144	492,58		
Total	79735,8	149			
Greutatea boabelor					
Genotipul	14,43	2	7,22	4,63**	4,93
RAD	7,62	1	7,62	4,89*	2,60
Interacțiunea Genotip - RAD	46,26	2	23,13	14,86***	15,81
Rezidual	224,16	144	1,56		
Total	292,47	149			
Genotipul	38,54	2	19,27	14,51***	15,01
Cultura *in vitro*	0,30	1	0,30	0,23	0,15
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	26,60	2	13,30	10,01***	10,35
Rezidual	191,28	144	1,33		
Total	256,72	149			
Masa a 1000 boabe					
Genotipul	1372,82	2	686,41	10,14***	8,22
RAD	865,07	1	865,07	12,78***	5,18
Interacțiunea Genotip - RAD	4701,19	2	2350,6	34,74***	28,17
Rezidual	9743,8	144	67,67		
Total	16682,9	149			
Genotipul	5660,06	2	2830,03	47,29***	34,63
Cultura *in vitro*	265,96	1	265,96	4,44*	1,62
Interacțiunea Genotip - *in vitro*	1797,33	2	898,67	15,02***	10,99
Rezidual	8617,18	144	59,84		
Total	16340,5	149			

Notă: * ,**, *** - diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Anexa 7. Act de implementare a rezultatelor științifice în instruire

CONSILIUL MUNICIPAL CHIȘINĂU
PRIMARIA GENERALĂ A MUNICIPIULUI CHIȘINĂU
DIRECȚIA GENERALĂ EDUCAȚIE, TINERET ȘI SPORT
LICEUL TEORETIC CU PROFIL DE ARTE „ELENA ALISTAR"

nr. 01-03/238 din 30.06.2023

ACT

de implementare în practică a activităților științifice

Prin prezenta se confirmă că rezultatele investigațiilor științifice, efectuate în cadrul tezei de doctor în științe biologice **„Variabilitatea somaclonală și indusă de radiație la triticale *in vitro*"**, realizată de dna CIOBANU RENATA sunt implementate în procesul didactic la disciplinele Biologie și Chimie, în cadrul lecțiilor practice, clasele a X- XII-a la Liceul Teoretic cu profil de arte „Elena Alistar" din mun.Chișinău.

Directorul LTPA „Elena Alistar" Lilia Babuc

Anexa 8. Acte de implementare a rezultatelor științifice în cercetare

Aprob
Secretarul științific al Institutului de Genetică,
Fiziologie și Protecție a Plantelor al USM

SMEREA Svetlana, dr. șt. biol.

ACT DE IMPLEMENTARE A REZULTATELOR ȘTIINȚIFICE

Prin prezenta se confirmă implementarea rezultatelor cercetărilor științifice realizate în cadrul tezei de doctor în științe biologice „Variabilitatea somaclonală și indusă de radiație la triticale *in vitro*" a d-nei CIOBANU Renata în cadrul Laboratorului Resurse Genetice Vegetale al IGFPP. Au fost transmise pentru depozitare în Banca de gene, fiind apreciate de interes științific pentru studii genetice și ameliorative, somaclonele SC_2-SC_3 a genotipului Ingen 93 (obținut *in vitro* și RAD) și genotipul 188TR5027 RAD.

Șef Laborator Resurse Genetice Vegetale GANEA Anatolie, dr., conf. cercet.

Cercetător științific CIOBANU Renata

15.06.2023

Aprob
Secretarul ştiinţific al Institutului de Genetică,
Fiziologie şi Protecţie a Plantelor al USM

SMEREA Svetlana, dr. şt. biol.

ACT DE IMPLEMENTARE A REZULTATELOR ŞTIINŢIFICE

Prin prezenta se confirmă implementarea rezultatelor cercetărilor ştiinţifice realizate în cadrul tezei de doctor în ştiinţe biologice „Variabilitatea somaclonală şi indusă de radiaţie la triticale *in vitro*" a d-nei CIOBANU Renata în cadrul Laboratorului Genetică aplicată al IGFPP. Au fost transmise somaclonele SC_2-SC_3 ale genotipurilor Ingen 93 (obţinut *in vitro* şi sub acţiunea radiaţiei gamma) şi 188TR5027 (sub acţiunea radiaţiei gamma), pentru includerea în evaluările comparative de către cercetătorii grupului Genetica şi ameliorarea cerealelor păioase, fiind apreciate de perspectivă.

Şef Laborator Genetică Aplicată LUPAŞCU Galina, dr. hab., prof.cerc.

Cercetător ştiinţific CIOBANU Renata

15.06.2023

Declaraţia privind asumarea răspunderii

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teză sunt rezultatul propriilor cercetări şi realizări ştiinţifice. Conştientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecinţele în conformitate cu legislaţia în vigoare.

Ciobanu Renata



Data 27.07.2023

CURRICULUM VITAE



CIOBANU Renata

Informații personale

Cetătenie MD
✉ *renataciobanu3@gmail.com*

Data nașterii: 10 februarie 1976

Studii superioare:

- 1997-2000 - *studii de doctorat*, Institutul de Genetică AȘM, specialitatea - 03.00.15 Genetica/ 162.01 - Genetica vegetală.
- 1992-1997 - *studii de licență*, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie, specialitatea - Biologie. Diplomă de Licență seria AL Nr. 006168

Domeniile de interes științific:
Biologie și genetică, biotehnologie.

Stagii:

- 26 mai - 3 iunie 2023 - Cursul „Metodele de integrare curricular în procesul educațional”, A.O. Inovație în Educație de Performanță, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare,* 5 credite.
- 10 - 17 martie 2023 - Cursul „Dezvoltarea competențelor digitale ale cadrelor didactice” A.O. Inovație în Educație de Performanță, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare,* 5 credite.
- 9 martie 2023 - Seminarul de dezvoltare a măiestriei pedagogice organizat de A.O. Inovație în Educație de Performanță, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare,*1 credit.
- 9 februarie 2023 - Seminarul de dezvoltare a măiestriei pedagogice organizat de A.O. Inovație în Educație de Performanță, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare,* 1 credit.
- 12 ianuarie 2023 - Seminarul științifico-metodic „Didactica Biologiei și Chimiei” organizat de către Facultatea de Biologie și Chimie a Universității Pedagogice de Stat Ion Creangă, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare*, 1 credit.
- 15 - 20 august 2022 - cursul „STEAM - inovație în educația viitorului”, A.O. Inovație în Educație de Performanță, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare*, 5 credite.
- 1, 8, 22, 29 iunie - serie de seminare online dedicate ȘTIINȚEI RESPONSABILE, cu participare internațională, Chișinău Republica Moldova, *Certificat de participare.*
- 19 septembrie - 9 octombrie 2020 - Cursuri specializate de formare continuă, Didactica disciplinei școlare Chimia, Psihopedagogie, Tehnologii Informaționale și Comunicaționale în Educație Dezvoltarea profesională, Institutul de Formare Continuă, Chișinău, Republica Moldova, *Certificat de participare*, 10 credite.

- Iulie - septembrie 2020 - Curs de formare ”Dezvoltarea competențelor digitale ale cadrelor didactice pentru predare-învățare-evaluare, cu Gsuit pentru educație”, MECC *Certificat de participare,* 2, credite.
- 6 august 2019 - Program de formare profesională ”Implementare a curriculumului la disciplina Chimie, ediția 2019, LT ”L. Deleanu”, Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare,* 1 credit.
- 26 octombrie 2017 - Seminar municipal ”Metodologia formării abilităților și competențelor de cercetare științifică a elevilor în domeniul chimiei și ecologiei în scopul participării eficiente în cadrul activităților competitive de masă”, LT ”V. Lupu” Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.
- 1 aprilie 2017 - Seminarul științifico-didactic ”Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă”, ediția IV curaportul „Dezvoltarea creativității la elevi în procesul predării – învățării la chimie”, US Tiraspol, *Certificat de participare*, 1 credit.
- 2 aprilie 2016 - Seminar științifico-didactic ”Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă, ediția III”, cu raportul „Testul - instrument de evaluare a indicatorilor de performanță”, US Tiraspol, *Certificat de participare,* 1 credit.
- Decembrie 2016 - Masă rotundă cu genericul „Aspecte practice privind funcționarea sistemului național de protecție și valorificare a soiurilor de plante”, organizat de Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală (AGEPI), în colaborare cu Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante (CSTSP) Chișinău, Republica Moldova.
- Iunie 2016 - Seminar de instruire cu genericul „Documentele de brevet ca sursă de informaţiitehnologice, juridiceşi de business”,organizat de cătreAgenţia de Stat pentru Proprietate Intelectuală (AGEPI) Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.
- Mai 2015 - Seminar de instruire: „Protecţia şi valorificarea proprietăţii intelectuale în Republica Moldova”, organizat de către Agenţia de Stat pentru Proprietate Intelectuală (AGEPI) Chișinău, Republica Moldova. *Certificat de participare*.

Activitatea profesională:

- **septembrie 2017** - **prezent** - profesor de chimie, Liceul Teoretic cu profil de Arte „Elena Alistar”, mun. Chișinău;
- **ianuarie 2012** - **prezent** - cercetător ştiinţific, Institutul de Genetică, Fiziologie şi Protecţie a Plantelor;
- **noiembrie 2000** - **ianuarie 2012** - cercetător ştiinţific stagiar; Institutul de Genetică al AŞM;
- **septembrie** - **mai 1997** - profesor de biologie, liceul „Gheorghe Asachi”, mun. Chișinău;
- **august 1997** - biolog categoria I, Institutul de Genetică al AŞM.

Participări în proiecte ştiinţifice naţionale şi internaţionale.

Proiecte instituționale:

- **20.80009.5107.03** „Valorificarea eficientă a resurselor genetice vegetale și biotehnologiilor avansate în scopul sporirii adaptabilității plantelor de cultură și schimbările climatice”, proiectul de cercetare și inovare din cadrul Programului de Stat, Prioritatea Strategică N2, Agricultura durabilă, Securitatea alimentară, Siguranța alimentelor, 2020-2023.
- **15.817.05.11F** „Sisteme de inducere a variabilităţii şi rezistenţei plantelor, procedee tehnologice de sporire a productivităţii culturilor agricole”, 2015-2019.
- **11.817.0.4.04F** „Biotehnologii avansate şi mecanisme genetice şi fiziologice de inducere a variabilităţii genotipice şi formarea unui potenţial genetic sporit de productivitate şi rezistenţă a C_3 şi C_4 plantelor”, 2011-2014.

- **06.407.005F** „Studiul variabilităţii genetice indusă de factori fizici, chimici şi biologici *in vivo* şi *in vitro*, evaluarea genetico - moleculară a caracterelor de productivitate, calitate şi rezistenţa la condiţiile nocive ale mediului”, 2006-2010.
- **01.14.02F** „Biotehnologii moderne (genetico-moleculare) de sporire a variabilităţii ereditare valoroase (rezistenţă, productivitate, calităţi) la plantele de cultură”, 2001-2005.

Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

2022

- Simpozionul ştiinţific internaţional „Biotehnologii avansate – realizărişi perspective”, Ediția VI, 3-4 octombrie 2022, Chişinău, Republica Moldova. ***Raport, teză, Certificat de participare.***
- The National Conference with international participation „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”, Ediția II, 29-30 septembrie 2022, Chișinău, Republica Moldova: Moldova State University. ***Teză, Certificat de participare.***

2021

- Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor”, Ediția VII, 4-5 octombrie 2021, Chişinău, Republica Moldova. ***Articol.***

2020

- Conferința Științifico - practică cu participare internaţională, „Realizări științifice în ameliorare și tehnologii inovative la culturile cerealiere în contextual schimbărilor climaterice”, 4-5 septembrie 2020, Chișinău, Republica Moldova. ***Articol.***

2019

- Simpozionul ştiinţific internaţional „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția V, 3-4 octombrie 2019, Chişinău, Republica Moldova. ***Poster, teză, Certificat de participare.***
- The National Conference with international participation „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community”, 21-22 octombrie 2019, Chişinău, Republica Moldova: State University „Dimitrie Cantemir”. ***Raport, Certificat de participare.***
- Conferința științifică națională cu participare internațională „Ştiinţele vieţii în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”. 21-22 octombrie 2019, Chişinău, Republica Moldova. ***Teză.***

2018

- Manifestare științifică cu participare internațională „Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice”, Ediția II, 23 noiembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova: Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”. ***Articol.***

2016

- Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția IV, 3-4 octombrie 2016, Chișinău, Republica Moldova. ***Poster, Teză.***

2014

- Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor”, Ediția V, 23-24 octombrie 2014, Chişinău, Republica Moldova. ***Articol.***

2013

- Simpozionul ştiinţific naţional cu participare internaţională „Biotehnologii avansate – realizări şi perspective”, Ediția III, 24-25 octombrie 2013, Chişinău, Republica Moldova. ***Teză.***

2011

- Conferința științifică în memoria academicianului Boris Matienco, „Structura și funcționalitatea sistemelor biologice - diversitate și universalitate”, 17 noiembrie 2011, Chișinău. Republica Moldova. ***Articol.***

Lucrări științifice și ştiinţifico-metodice publicate: 28 lucrări științifice (inclusiv 16 publicații de monoautor): 1 articol în revistă recenzată internațională, 9 articol în culegeri științifice şi 6 comunicări în cadrul unor manifestări ştiinţifice naţionale.

Cunoașterea limbilor: limba română - limba maternă, limba rusă - bine, limba engleză - mediu, limba franceză - mediu.

Date de contact de serviciu: Laboratorul Genetica Rezistenței Plantelor, Institutul de Genetică Fiziologie și Protecție a Plantelor al USM. Adresa: str. Padurii, 20, MD-2002, Chisinau, Republica Moldova, tel.: +373 77-04-47