UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR

Cu titlu de manuscris:
C.Z.U: [633.11:631.528.632]:631.52(043.3)

CIOBANU RENATA

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

162.01. Genetică vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIŞINĂU, 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului Genetica Rezistenței Plantelor al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Universității de Stat din Moldova

Conducător științific:
ANDRONIC Larisa, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

Referenți oficiali:
DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician al AȘM
GRATI Vasile, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

Componența Consiliului Științific Specializat:
LUPAȘCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător, membru corespondent al AȘM, ***președinte***
COTENCO Eugenia, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, ***secretar științific***
BOTNARI Vasile, doctor habilitat în științe agricole, conferențiar cercetător
CLAPCO Steliana, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
SMEREA Svetlana, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
ZGARDAN Dan, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la **22.12.2023**, ora **9^{00}**, în ședința Consuliului Științific Specializat **D 162.01-23-91**, din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Universității de Stat din Moldova, str. Pădurii, 20, sala de ședințe, et. 2, MD 2002, Chișinău, Republica Moldova, tel. (+37322) 77 04 47, fax: (+37322) 55 61 80, e-mail: institut.gfpp@gmail.com.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate în Biblioteca Universității de Stat din Moldova și pe pagina web a ANACEC (https://www.anacec.md/).

Rezumatul a fost expediat la data „18” noiembrie 2023

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat
COTENCO Eugenia,
doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător științific
ANDRONIC Larisa,
doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

Autor
CIOBANU Renata

© Ciobanu Renata, 2023

CUPRINS

REPERE CONCEPTUALE ALE TEZEI 4

CONȚINUTUL TEZEI 6

1. CONCEPTE GENETICE DE SPORIRE A VARIABILITĂȚII GENETICE LA PLANTELE DE CULTURĂ 7

2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ŞI METODE DE CERCETARE 7

3. APRECIEREA POTENȚIALULUI MORFOGENETIC ȘI REGENERATIV AL GENOTIPURILOR DE TRITICALE ÎN CULTURA *IN VITRO* …….. 7

3.1. Inițierea calusogenezei și regenerării de plantule din embrioni maturi de triticale…….…. 11

3.2. Variabilitatea indusă de razele gama în cultura *in vitro* la triticale..... 13

3.3. Obținerea regeneranților de triticale prin metoda *in vitro* și mutageneza fizică..... 15

4. ASPECTE GENETICE A GENOTIPURILOR DE TRITICALE OBȚINUTE PRIN MUTAGENEZA FIZICĂ ȘI CULTURA *IN VITRO*.. 15

4.1. Evaluarea caracterelor biomorfologice la somaclonele de triticale obținute din embrioni iradiați cu raze gama …….……. 15

4.2. Analiza polimorfismului genetic al somaclonelor SC_1 la triticale ……..… 17

4.3. Expresia caracterelor cantitative ale somaclonelor SC_2 de triticale recuperate din variantele supuse iradierii și culturii *in vitro*..... 20

4.4. Studiul variabilității fenotipice și genotipice a unor caractere cantitative ale somaclonelor SC_1 și SC_2 de triticale ……..... 23

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE 27

BIBLIOGRAFIE 28

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI .. 30

ADNOTĂRI (*română, engleză, rusă*) 32

REPERELE CONCEPTUALE ALE TEZEI

Actualitatea și importanța temei abordate. 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); - productiv (creșterea în continuare a dozelor de îngrășăminte cu azot 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) [30].

Alegerea triticalelor ca obiect de studiu este asociată cu combinația unică în această cultură a caracteristicilor 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. 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 [20]. Pentru ameliorarea triticalelor, este necesară îmbogățirea fondului genetic al acestei culturi și creșterea eficienței selecției genotipurilor de perspectivă.

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 [13].

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, genotipurile obținute pot deține noi combinații alelice. Actualmente în baza de date FAO/AIEA sunt înregistrate peste 3200 de soiuri de plante produse prin mutageneză [25].

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 [12, 14, 21].

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 [14].

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 [10]. 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 obținut o semnificaţie economică recunoscută pentru alimentaţia umană, industrie şi furajarea animalelor [11].

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* în 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. Pentru inducerea variabilității somaclonale a fost utilizată metoda culturii *in vitro* (algoritm 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, utilizând 12 primeri. Similaritatea genetică a genotipurilor a fost stabilită în baza distanțelor genetice și a indicilor de similaritate prin metoda 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 varianţei ANOVA.

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.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducere** se argumentează actualitatea şi importanţa problemei abordate, sunt formulate scopul şi obiectivele cercetării, prezentată ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare, justificarea metodelor de cercetare, noutatea și originalitatea ştiinţifică, importanţa teoretică, valoarea aplicativă a lucrării şi sumarul compartimentelor tezei.

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

Compartimentul include sinteza datelor recente 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.

2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELOR DE CERCETARE

Obiectul de studiu. 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. Experiențele au fost efectuate în condiții de laborator, solariu și câmp conform recomandărilor standard.

Metode de cercetare. Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost utilizate următoarele metode: biotehnologice (prepararea mediilor nutritive, inocularea explantelor, subcultivarea calusului, aclimatizarea plantulelor), metode morfometrice (observații fenologice și analiza caracterelor cantitative după ghidul UPOV), citologice (determinarea cotei celulelor cu aberaţii în mitoză), moleculare (extragerea ADN, amplificarea și electroforeza) prin genotiparea RAPD cu implicarea a 12 primeri. Pentru evidenţierea polimorfismului s-a utilizat *indicele PIC* (*Polymorphic Information Content*) după Anderson J. Distanţa genetică (DG) s-a determinat după Melchinger A. și Nei M. pe baza *indicelui de similaritate Jaccard*, iar pe baza matricelor generate s-au elaborat dendrogramele de repartiție a genotipurilor, utilizând metoda UPGMA (*Unweighted Pairwise Group Method with Arithmetic mean*).

Metode statistice de prelucrare a datelor. Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin calcularea următorilor parametri: *valoarea medie* ($\bar{x}$), *eroarea standard* (es), *coeficientul de variaţie* (CV, %), *coeficientul de heritabilitate* (h^2), *varianța genotipică* și *fenotipică* după Falconer D. [17], *coeficientul variației genotipică* (C_{VG}) și *fenotipică* (C_{VF}) conform Singh R., Chaudhury B. [24].

Experiențele s-au efectuat după schema analizei dispersionale, fiind 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.

3. APRECIEREA POTENȚIALULUI MORFOGENETIC ȘI 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 obţinere a produselor vegetale dorite [19].

3.1. Inițierea calusogenezei și regenerării de plantule din embrioni maturi de triticale

Condiţiile de cultivare *in vitro*, componența mediilor nutrtive, în special balanţa hormonală influenţează iniţierea, proliferarea ţesuturilor şi capacitatea de regenerare.

În vederea evaluărilor biotehnologice s-a selectat și optimizat un mediu comun pentru inducerea calusogenezei din diferite tipuri de explante: embrioni maturi și fragmente foliare.

Astfel, au fost testate 6 medii nutritive ce aveau ca bază mediul Murashige şi Skoog (1962) suplimentat cu reglatori de creștere, care se deosebeau prin raportul concentrației în mediu (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.

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

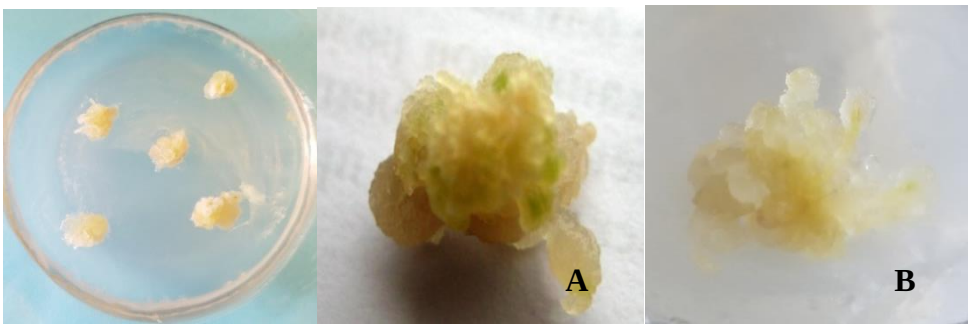


Fig. 3.1. Tipurile de calus inițiate: A - calus compact (tip I); B - calus friabil (tip II).

Pe parcursul cultivărilor s-a urmărit dezvoltarea tipurilor de calus. În variantele experimentale s-a iniţiat cu preponderenţă calus de tip I (Figura 3.2).

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. Dintre mediile analizate, cele mai înalte rate de calusare au fost obţinute pe varianta de mediu Nr. 2 (MS (1962) suplimentat cu 2,4-D (2,5 mg/l) şi kinetină (0,2 mg/l)), dovedit eficient la toate genotipurile de triticale (90-95%) [4].

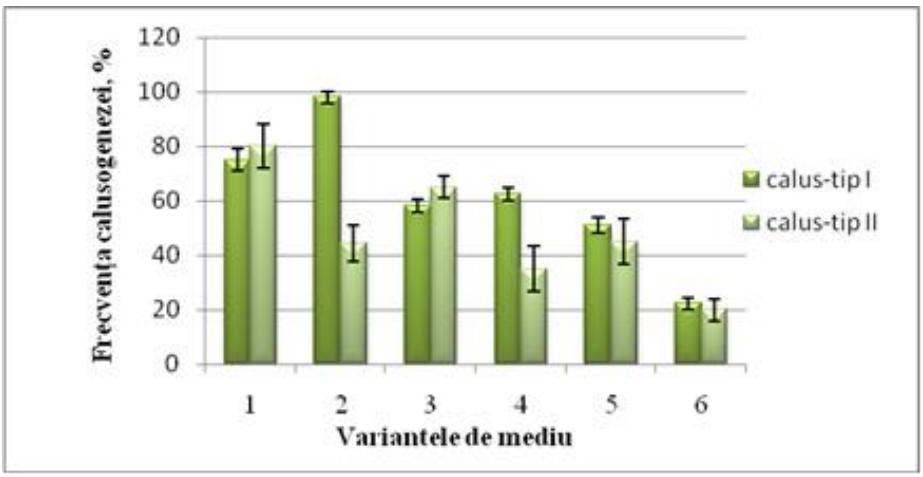


Fig. 3.2. Tipul de calus format în dependență de mediul de cultură.
(aici și în următoarele figuri barele reprezintă eroarea standard).
Notă: **1** – MS + 2,4-D 3,0 mg/l; **2** – MS + 2,4-D 2,5 mg/l + kinetină 0,2 mg/l; **3 –** MS + 2,4-D 2,0 mg/l + kinetină 0,5 mg/l; **4** –MS + 2,4-D 2,5 mg/l + kinetină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

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 [9].

În urma prelucrării statistice, prin aplicarea testului ANOVA s-a constatat că mediul de cultură, genotipul cât şi interacţiunea lor au avut o influenţă semnificativă (P≤0,001) asupra frecvenţei calusogenezei. Puterea de influență a mediului de cultură fiind maximă 34,91%, genotipul reprezintă o sursă de variaţie de 9,3% şi interacţiunea genotip – mediu nutritiv 16,46%.

Interacțiunea dintre factorii „genotip" și „vârsta explantului" denotă o influență semnificativă P≤0,001 în stabilirea unui răspuns calusogenetic pozitiv. În scopul cercetării s-au inițiat culturi de calus din fragmente foliare de la cele 8 genotipuri analizate. 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 a 2-a zi de cultivare (78,63%). Valorile cele mai mari s-au înregistrat pentru genotipurile: CAD 2/917 (89,12%), LT 76872 (81,32%), Ingen 35 (80,67%), Ingen 33 (80,37%), Rodlen (80,19%) (Figura 3.3).

Conform datelor obținute se atestă că, capacitatea de calusare la triticale este controlată de vârsta explantului şi genotip [8]. Aplicarea testului ANOVA a stabilit, că genotipul, vârsta explantului cât şi interacţiunea lor au avut o influenţă semnificativă asupra frecvenţei inducerii calusului. Impact maxim 70,64% a fost înregistrat pentru vârsta explantului, urmat de genotip cu 6,68%, în timp ce interacţiunea „genotip" – „vârsta explantului" a constituit doar 0,94%.

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

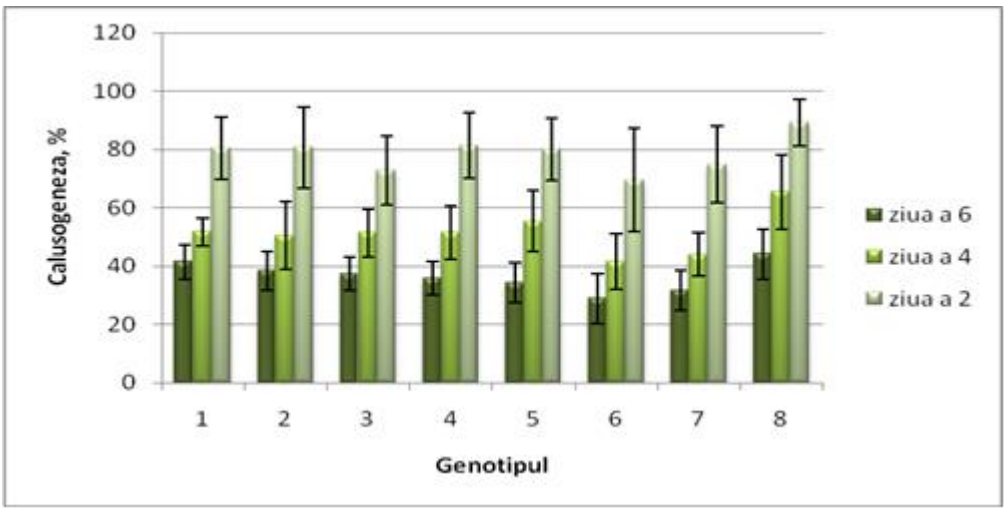


Fig. 3.3. Influența interacțiunii factorilor „genotip" - „vârsta explantului" asupra frecvenței calusogenezei.

Notă: 1 - Ingen 33; 2 - Ingen 35; 3 - Ingen 93; 4 - LT 76872; 5 – Rodlen; 6 – Colina; 7 - 188 TR 5021; 8 - CAD 2/917.

Capacitatea de regenerare a plantulelor din calusul obținut de la embrionii maturi de triticale. Cercetările 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. În acest scop calusurile cu zone morfogene au fost transferate pe mediu pentru regenerare MS suplimentat cu AIA (0,5 mg/l) şi BAP (1 mg/l) și subcultivate pe medii nutritive proaspete, fiind transferate la fiecare 3 săptămâni.

Conform datelor obținute, frecvenţa regenerării lăstarilor per calus embriogen a atins valori ce variază între 17,27 - 43,27%. Cea mai sporită capacitate de formare a lăstarilor s-a evidențiat la genotipurile CAD 2/917, Ingen 33 şi Colina, iar la LT 76872 şi Rodlen fiind minime. Cotă majoră a prezentat genotipul CAD 2/917, constituind 13,66 lăstari per calus.

Rezultatele obţinute demonstrează cert dependența proceselor de formare și dezvoltare a lăstarilor de origine calusogenă de genotip și mediul 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.

Rata medie de înrădăcinare a lăstarilor a constituit 72,39%. Regeneranții au manifestat capacitate diferită de aclimatizare, care în medie a fost 62,42% (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Capacitatea de regenerare și înrădăcinare a plantelor obținute din calus embriogen (valoarea medie±ES)

Genotipul	Calus embriogen (%)	Calus regenerativ (%)	Lăstari înrădăcinaţi (%)
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 asupra capacității de regenerare, puterea de influență constituind 73,17%. 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 [2; 5].

Variabilitatea indusă de cultura *in vitro* la celulele calusale în baza frecvenței și spectrului aberațiilor cromozomiale. În rezultatul examinării celulelor calusale la diverse termene de cultivare *in vitro* s-au evidențiat diferențe majore ale aspectului morfologic al celulelor evidențiate [6]. 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.

S-a stabilit, că activitatea mitotică a celulelor este dependentă de genotip, indicele mitotic constituind valori cuprinse între 13,58 - 55,04%. 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 - 12,5 %. S-a evidențiat, că cultura *in vitro* induce mutații în anafază-telofază de tipul: celule binucleate, dispunerea ciclică a cromozomilor, fragmente cromozomiale punctiforme, ce derivă din instabilităţile procesului de mitoză în celulele calusale şi care pot fi transmise regeneranților.

Stabilitatea citogenetică a calusului este una dintre premisele cheie pentru propagarea clonală *in vitro* eficientă 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

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. 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.

Efectul dozelor razelor gama în procesul mutațional declanșat în celulele calusale. 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. S-a constatat, că radiațiile gama în limitele dozelor 50-150 Gy a avut un efect stimulator asupra creșterii calusului, iar dozele 200-250 Gy au avut impact depresiv asupra calusogenezei (Figura 3.4).

S-a remarcat o reacție specifică a fiecărui genotip la acțiunea razelor gama la doza de 150 Gy, 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.

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

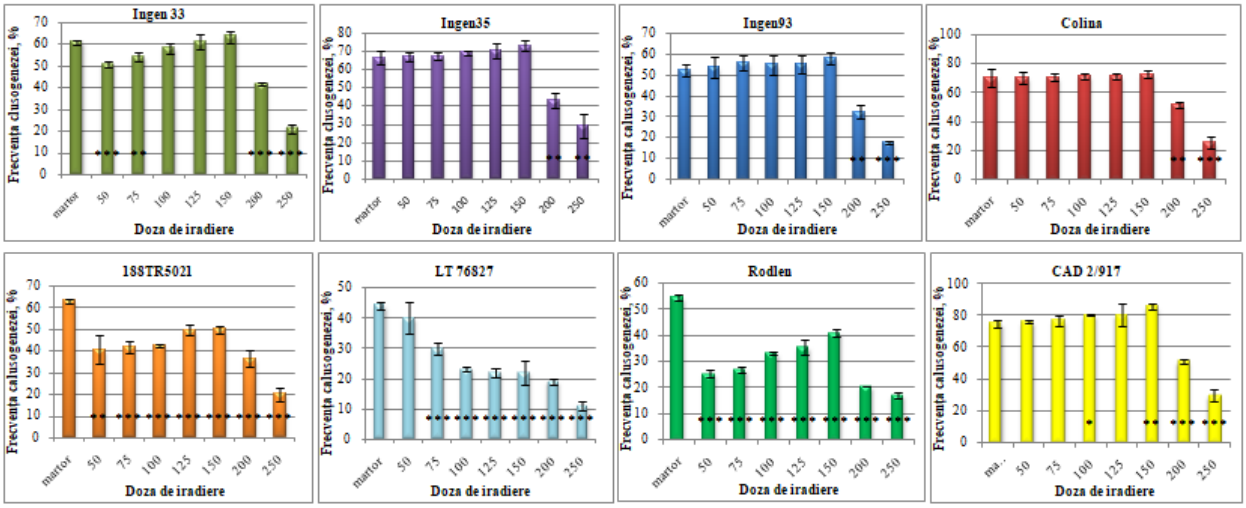


Fig. 3.4. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţia gama asupra frecvenţei calusogenezei.
Notă: *, **, *** - semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

Impactul radiaţiei gama asupra acumulării masei calusale şi regenerării plantulelor. Determinarea cineticii creşterii calusurilor s-a estimat prin cântărirea biomasei calusale, 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 generat calus 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.

În rezultatul studiului s-a constatat, că doza de radiație 150 Gy a fost cea mai eficace în stimularea acumulării biomasei calusale în comparație cu martorul [1]. Coeficientul de variație, pentru 150 Gy constituie 3,08 - 14,54%, ceea ce corespunde unui nivel mic și mediu de variabilitate. Cele mai mari valori au fost înregistrate de genotipurile Ingen 35, masa calusului constituind 879,57 mg, față de 814,08 mg la martor, urmate de Ingen 33 și CAD 2/917.

S-a confirmat cantitativ efectul radiaţiei asupra calusului embriogen și regenerării. 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 3.3).

Tabelul 3.3. 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

Influența razelor gama asupra morfogenezei. 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.

În rezultatul analizei datelor obținute s-a evidențiat reacția specifică a genotipului în complex cu doza de iradiere, care au influențat semnificativ frecvența morfogenezei. S-a stabilit, că la dozele de 50-150 Gy pentru genotipurile Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93 și CAD 2/917, valorile medii au crescut față de martor (Figura 3.5).

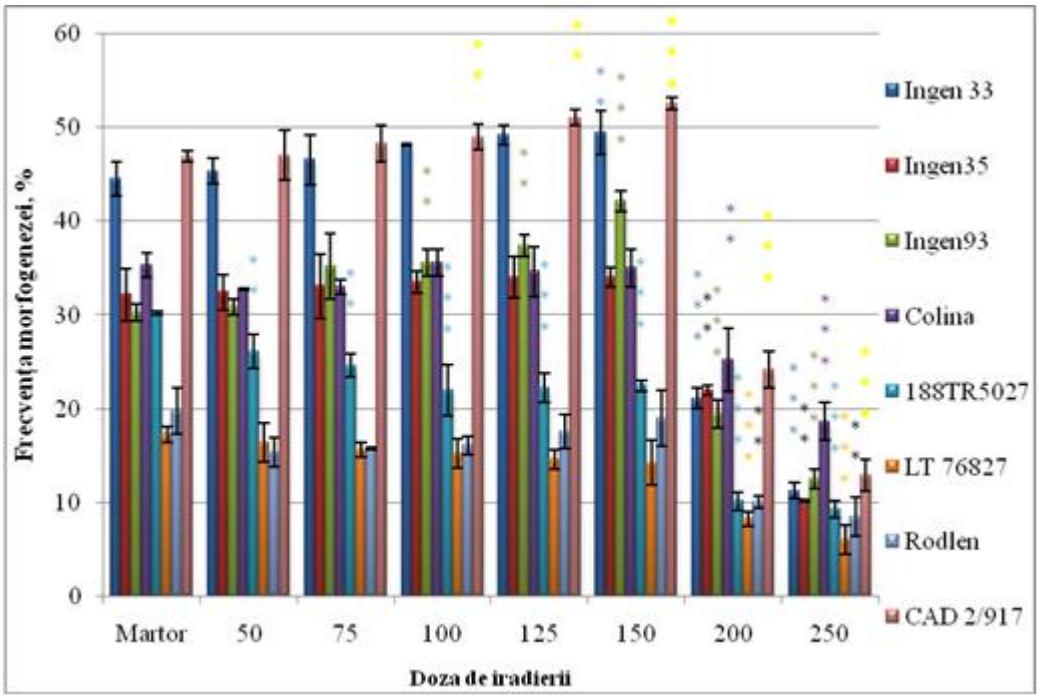


Fig. 3.5. Influența interacțiunii factorilor genotip-radiație gama asupra frecvenței morfogenezei.
Notă: **,*** - semnificativ pentru P≤0,01; 0,001.

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%.

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

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 [7].

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

Acțiunea radiației gama asupra frecvenței regenerării la doza de 150 Gy pentru genotipurile Ingen 33, Ingen 93, Colina și CAD 2/917 a prezentat cele mai mari valori cuprinse între 33,99 - 43,05%, în comparație cu martorul. Valoarea minimă pentru

această doză de iradiere s-a atestat la genotipul LT 76827 (7,57%) și Rodlen (9,74%) (Figura 3.6).

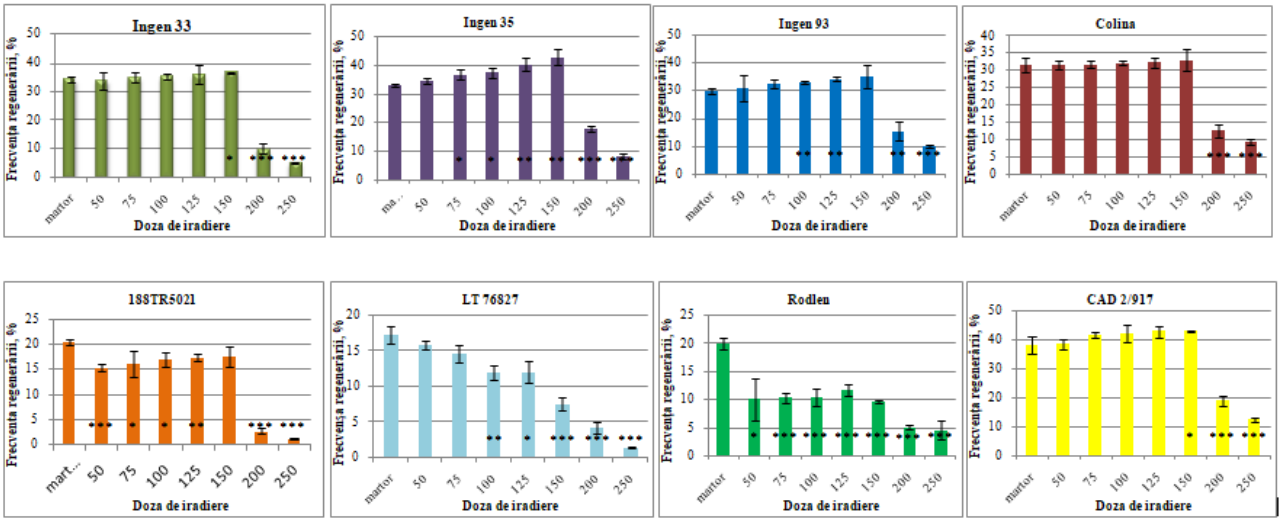


Fig. 3.6. Influenţa interacţiunii factorilor genotip - radiaţie asupra frecvenţei regenerării.
Notă: *, **, *** - semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001

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.

Rata medie de înrădăcinare a lăstarilor a fost 40,66%. În faza de aclimatizare somaclonele au manifestat capacitate diferită de adaptare, care în medie a atins 42,16% (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. 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

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 [3].

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. Astfel, evidențiindu-se somaclonele genotipurilor Ingen 33, Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021 și CAD 2/917.

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

Diversitatea genetică poate fi estimată, folosind trăsăturile morfologice. Dezvoltarea și disponibilitatea unor noi resurse genetice sunt esențiale pentru îmbunătățirea soiurilor, iar pentru diferențierea genotipurilor poate fi utilizată caracterizarea fenotipică [28].

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, cea ce confirmă eficiența folosirii culturii de calus în inducerea variabilității, prin obținerea somaclonelor ce prezintă interes agronomic [22; 23; 27].

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.

Valorile medii ale caracterului *talia plantei* variază pentru somaclonele SC_1 obținute prin cultura *in vitro* și este dependentă de genotip. 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%). Valoare maximă a caracterului *talia plantei* a prezentat genotipul Ingen 93 (*in vitro*). La variantele iradiate s-au înregistrat valori medii mai mici față de martor pentru toate genotipurile cu 9,98 - 31,36 %, demonstrând efect inhibitor asupra caracterului *talia plantei* [15]. Cele mai mici valori s-au înregistrat la genotipul 188TR 5021 (RAD), obținându-se somaclone pitice și semipitice. Coeficientul de variație a caracterului *talia plantei* a atins valori mici și medii (4,57 - 15,68%), indicând stabilitate.

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 caracterului *frați fertili per plantă* (0,5), s-a estimat pentru genotipul 188TR 5021 (*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. Pentru caracterul *numărul de frați fertili per plantă*, coeficientul de variație este mare (39,97 - 114,47%), ceea ce atestă o variație puternică (Tabelul 4.1).

Tabel 4.1. Variația caracterelor biomorfologice la somaclonele SC_1 de triticale

Caracterul / Genotipul	Număr de frați fertili	Talia plantei (cm)	Lungimea spicului principal (cm)	Lungimea ultimului internod	Număr 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	39,7±1,23 15,53
RAD Ingen 35	0,76±0,16 109,29	80,18±1,62 *** 10,13	11,40±0,22 9,96	23,42±0,52 11,25	13,08±2,26 ** 86,71	0,44±0,09 ** 102,07	24,88±2,7 54,42
In vitro Ingen 35	0,92±0,17 93,71	101,4±1,39 *** 6,86	12,70±0,2 *** 7,87	27,30±0,48 ** 8,83	17,32±2,44 70,64	0,70±0,12 87,44	34,22±3,7 *** 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: * ,**, *** - diferențe semnificative pentru P≤0,05; 0,01; 0,001.

La variantele supuse iradierii 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*).

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*). 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 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%).

Valoarea medie pentru caracterul *greutatea boabelor* a înregistrat diferențe semnificative dintre variante 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.

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

Analiza dispersională a rezultatelor obținute prin aplicarea testului ANOVA, denotă că asupra variației caracterelor cantitative la somaclonele de triticale SC_1 o contribuție semnificativă o are genotipul, radiația, cultura *in vitro*, precum și interacțiunea dintre genotip și factorii analizați cu o acțiune maximală.

S-a evidențiat interacțiunea genotipului cu cultura *in vitro*, puterea de influență a atins cele mai înalte valori 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%).

Influența genotipului a prezentat cele mai înalte valori pentru caracterele: *greutatea boabelor* - 22,70% (cultura *in vitro*), *talia plantei* - 26,84% (RAD) și 28,74% pentru cultura *in vitro*, *lungimea ultimului internod* - 30,77% (cultura *in vitro*). Puterea de influență a radiației a avut valori maximale pentru indicii: *numărul de boabe* (21,87%) și *greutatea boabelor* (20,52 %). Cultura *in vitro* a demonstrat impact ce 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 93, obținute *in vitro*, după valorile medii în comparație cu martorul și varianta iradiată, fiind determinate de 5 caractere biomorfologice.

4.2. Analiza polimorfismului genetic al somaclonelor SC_1 la triticale

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 a 12 primeri decameri RAPD. Studiul somaclonelor *in vitro* (IV) și iradiate, precum și martorul (M), care reprezintă formele inițiale a evidențiat prezenţa a 114 fragmente amplificate, 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 (Tabelul. 4.2).

Tabelul 4.2. 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*).

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.

Numărul variat de benzi polimorfe (de la 1 la 9) în dependență de primer a determinat un nivel 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%) (Figura 4.1).

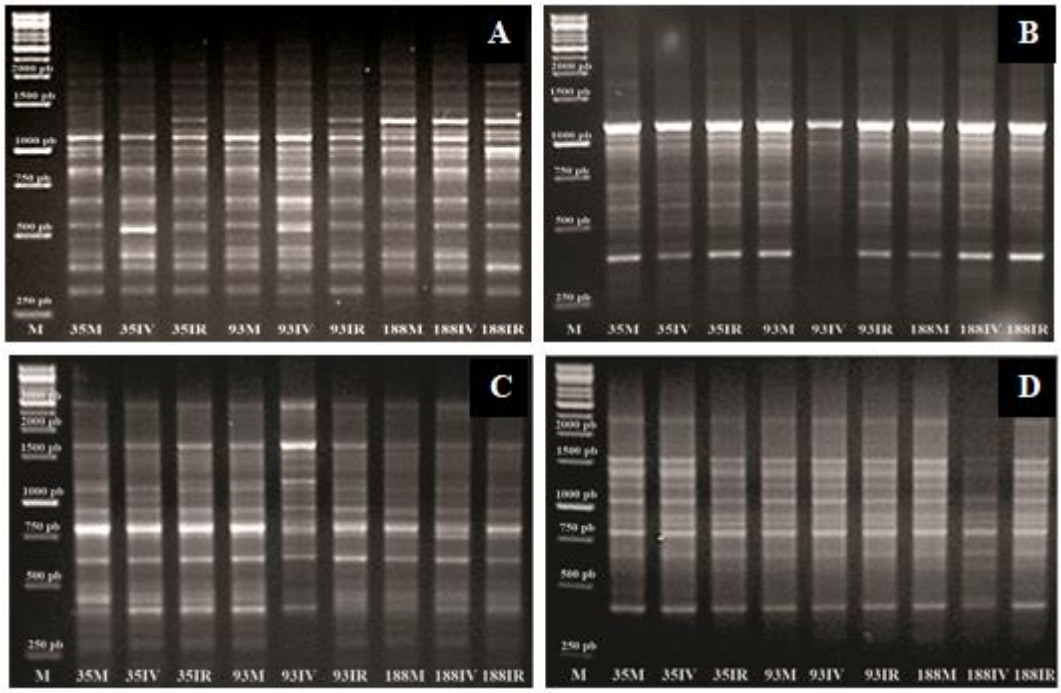


Fig. 4.1. Spectrele electroforetice ale fragmentelor ADN amplificate cu primerul OPB12 (A), OPC05 (B), OPC07 (C) și OPG10 (D).

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).

Cei 8 primeri enumerați mai sus se caracterizează și printr-o putere de discriminare a formelor de triticale analizate în baza indicelui PIC, 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, 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 obţinute 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 4.3).

Tabelul 4.3. 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	-		

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.

Analiza clusteriană în baza dendogramei (Figura 4.2) 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. 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.

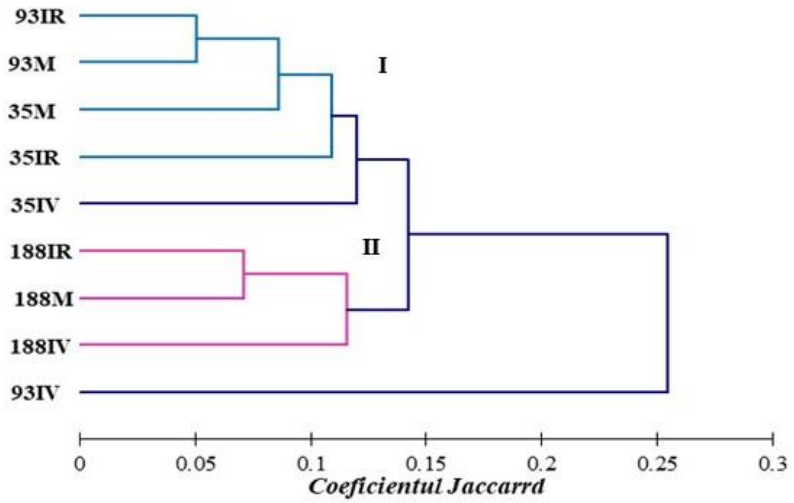


Fig. 4.2. Gruparea formelor de triticale în baza genotipării RAPD prin analiza UPGMA.
(*Unweighted Pair Group Methodwith Arithmetic Mean***)**
Notă: genotipuri: Ingen 35, Ingen 93, 188TR 5021; forme: martor (M), *in vitro* (IV), iradiat (IR).

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.

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

Evaluarea gradului de variabilitate a caracterului *numărul de frați fertili per plantă* a evidențiat reacție specifică pentru fiecare genotip studiat. S-au constatat valori maxime pentru genotipurile Ingen 93 (*in vitro*) cu 92% și 188TR (RAD) cu 85% în comparație cu martorul. Evaluarea variației pentru caracterul *numărul de frați fertili per plantă*, a atestat o variabilitate puternică (58,66 - 151,47%) (Tabelul 4.4).

Caracterul *talia plantei* a indicat valori medii mai mari cu 13 - 18%, față de martor la genotipul Ingen 93 (*in vitro*) și 188TR (RAD). Valoare maximă a prezentat genotipul 188TR (RAD). La varianta Ingen 35 iradiată s-au înregistrat valori medii mai mici față de martor cu 18,68 %. Coeficientul de variație a atins valori mici și medii (9,56 - 24,61%), indicând similitudinea indivizilor după *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%, iar pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), s-au atestat valori mai mari a caracterului cu 36% față de martor.

Tabel 4.4. 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.

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. Cea mai înaltă valoare a caracterului s-a înregistrat pentru somaclonele Ingen 93 (*in vitro*). Coeficientul de variație a acestui indice a constituit 9,14 - 16%, ceea ce corespunde cu un nivel mic și mediu de variabilitate (Tabelul 4.4).

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*). Aceste somaclone au înregistrat și cele mai mari valori a caracterului respectiv, *numărul de boabe per spic* a ajuns la 124. Efectul radiației gama s-a remarcat și asupra indicelui *numărul de boabe per spic principal*. S-au atestat diferențe semnificative cu 21% mai mici în comparație cu martorul pentru genotipul Ingen 35 (RAD), valorile medii fiind cele mai mici (60,2). Evaluarea variabilității acestui caracter a atestat o variație extinsă (20,81 - 58,40%) (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. 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.

Cercetările au relevat diferențe semnificative dintre variante pentru caracterul *greutatea boabelor* la toate genotipurile în comparație cu martorul. Cea mai mare valoare a acestui caracter la varianta iradiată față de martor a fost remarcată pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), constituind 50%, greutatea boabelor depășește 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). Somaclonele SC_2 Ingen 93 (*in vitro*) au avut valori mai mari cu 21% față de martor, greutatea boabelor constituind în medie 3,39 g. Valori medii mai mici de 1,66 ori față de martor, s-au stabilit la genotipurile Ingen 35 (*in vitro*). Coeficientul de variație a atins valori mari (22,98 - 77,56%), ceea ce denotă o variabilitate mare a acestui caracter.

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. Pentru genotipul 188TR 5021 (RAD), valorile medii au crescut cu 39,02% față de martor, iar pentru genotipul Ingen 35 (RAD s-au micșorat cu 30,9%.

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. Pentru genotipul Ingen 35 (*in vitro*), valorile medii au scăzut cu 25,36%. Coeficientul de variație a constituit 15,03 - 33,21%, ceea ce corespunde unui nivel mediu - înalt de variabilitate.

Aplicarea testului ANOVA a pus în evidenţă influenţa maximală a interacțiunii genotipului cu radiația gama, puterea de influență constituind 3,40 - 31,93%. Valorile cele mai mari au fost atestate la caracterele asociate productivității: *masa a 1000 boabe* (28,17%) și *numărul de boabe per spic* (31,93%). 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%).

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%. Pentru somaclonele iradiate, contribuția genotipului a atins valori de la 4,02-14,58%. Cele mai înalte valori a acestui indice, 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 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%.

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, determinative fiind 5 însușiri biomorfologice: talia plantei, lungimea spicului principal, numărul de boabe, greutatea boabelor și masa a 1000 boabe.

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 variantei genotipice și fenotipice a caracterelor cantitative [17]. Studiul parametrilor genetici: variantei fenotipice și genotipice, heritabilității și avantajului genetic, coeficientului de variație genotipică și fenotipică permit evidențierea caracterelor prețioase.

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), iar cele mai mici pentru *lungimea spicului principal*, SC_1 (Vg=0,57; Vph=0,64), SC_2 (Vg=0,52; Vph=0,61). Analizând valorile pentru caracterele productivității, s-a observat menținerea aceleași tendințe, valorile variantei genotipice fiind mai mari decât ale celei fenotipice (Tabelul 4.6). 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). 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.

Datele prezentate în tabelul 4.6 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. Pentru heritabilitatea în sens larg la 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 4.6). 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 *numărul de boabe per spic* (54,91%). 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 în ameliorarea triticalelor.

Tabelul 4.6. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor biomorfologice la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 35

Parametri/ Caracterul	$\bar{x}$± ES	Min÷max	Vg	Vph	CVG,%	CVF,%	h^2,%	AG	AG%
TPl *SC₁*	90,08±1,30	69÷111	112,00	114,03	11,75	11,86	**98,22**	21,61	23,99
TPl *SC₂*	71,89±1,59	43÷105,5	40,90	47,42	8,90	9,58	86,24	12,23	17,02
LgSP *SC₁*	11,78±0,14	9÷14,5	0,57	0,64	6,42	6,80	89,12	1,47	12,48
LgSP *SC₂*	13,52±0,19	11÷17,7	0,52	0,61	5,32	5,80	84,26	1.36	10,06
LgUint *SC₁*	25,12±0,38	16,5÷31,5	3,60	3,93	7,55	7,89	91,62	3,75	14,89
LgUint *SC₂*	25,30±0,79	11÷43,5	4,34	6,07	8,23	9,74	71,40	3,62	14,32
NrB *SC₁*	18,32±1,55	0÷46	27,26	33,70	28,50	31,69	80,89	9,67	52,80
NrB *SC₂*	73,61±3,05	9÷151	32,92	59,96	7,79	10,52	**54,91**	8,76	11,90
GB *SC₁*	0,71±0,07	0÷2,1	0,06	0,08	35,20	38,53	83,48	0,47	**66,25**
GB *SC₂*	2,90±0,17	0,2÷6,8	0,57	0,64	26,00	27,62	88,59	1,46	50,40
MMB *SC₁*	32,94±0,38	0÷100	48,58	56,11	21,16	22,74	86,57	13,36	40,56
MMB *SC₂*	37,70±1,24	15÷62,22	55,30	58,42	19,73	20,27	94,67	14,91	39,54

Notă: În tabelele 4.6 - 4.8: caractere: **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; Parametri: **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 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 4.7). 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 schimbarea mediului ambiant este un factor major care contribuie la variația caracterului.

Valorile cele mai mari ale CVG și CVF s-au atestat pentru indicii productivității. 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, au fost înregistrate valori majore ale heritabilității pentru toate caracterele (>60%), excepție pentru *lungimea ultimului internod*, care a prezentat valori negative la somaclonele SC_2, demonstrând efecte non-aditive.

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 4.7).

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.

Tabelul 4.7. Estimarea variației și a parametrilor genetici a caracterelor biomorfologice la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul Ingen 93

Parametri/ Caracterul	$\bar{x}$± ES	Min÷max	Vg	Vph	CVG,%	CVF,%	h^2,%	AG	AG%
TPl *SC₁*	105,95±1,54	66,5÷132	69,28	74,53	7,86	8,15	92,96	16,53	15,60
TPl *SC₂*	73,16±1,47	43,5÷106	39,32	44,76	8,57	9,15	87,83	12,11	16,55
LgSP *SC₁*	11,97±0,16	7÷14,5	0,23	0,30	3,99	4,56	76,66	0,86	7,20
LgSP *SC₂*	13,81±0,22	10÷18	2,14	2,23	10,60	10,80	96,28	2,96	21,43
LgUint *SC₁*	31,31±0,38	16,5÷31,5	5,55	6,01	7,53	7,83	92,36	4,66	14,90
LgUint *SC₂*	24,55±0,67	10,5÷43	-0,11	1,24	-	4,54	-8,67	-0,20	-0,81
NrB *SC₁*	48,84±3,32	2÷124	**644,95**	**660,76**	52,00	52,63	**97,61**	51,69	**105,83**
NrB *SC₂*	63,10±2,80	20÷124	179,30	197,92	21,22	22,29	90,59	26,25	41,60
GB *SC₁*	1,44±0,08	0,1÷2,7	0,12	0,14	24,15	25,82	87,44	0,67	46,51
GB *SC₂*	2,73±0,15	0,5÷6,2	0,69	0,75	30,58	31,73	**92,89**	1,65	60,72
MMB *SC₁*	36,49±0,82	14,3÷46,2	11,20	12,91	9,17	9,85	86,77	6,42	17,60
MMB *SC₂*	41,77±1,12	20,83÷83	33,77	36,23	13,83	14,41	92,10	11,42	27,34

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. 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.

Genotipul 188TR 5021 s-a remarcat prin valori care s-au deosebit esențial de celelalte genotipuri. Coeficientul de variație genotipică și fenotipică pentru somaclonele SC_1 a fost mai mare pentru toate caracterele luate în studiu în comparație cu valorile somaclonelor SC_2, iar diferențele dintre CVG și CVF mai 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 4.8).

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, greutatea boabelor și masa a 1000 de boabe [26].

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 4.8. Estimarea varianței și a parametrilor genetici a caracterelor biomorfologice la somaclonele SC_1 - SC_2 pentru genotipul 188TR 5021

Parametri/ Caracterul	$\bar{x}$± ES	Min÷max	Vg	Vph	CVG,%	CVF,%	h^2,%	AG	AG%
TPl *SC₁*	95,87±2,05	50,5÷124	295,20	299,80	17,92	18,06	**8,46**	35,12	36,63
TPl *SC₂*	75,76±1,64	40÷115,5	**36,42**	43,47	7,97	8,70	83,78	11,38	15,02
LgSP *SC₁*	13,34±0,24	8,5÷19	2,54	2,65	11,94	12,19	95,97	3,22	24,10
LgSP *SC₂*	14,17±0,26	10÷19	2,17	2,29	10,32	10,67	93,57	2,91	20,56
LgUint *SC₁*	34,06±0,89	19÷50,5	44,73	45,90	19,64	19,89	97,44	13,60	39,93
LgUint *SC₂*	27,19±0,93	11,5÷49,5	24,28	26,23	18,12	18,84	92,56	9,77	35,92
NrB *SC₁*	48,69±3,39	0÷123	727,49	742,47	55,39	55,96	97,98	55,00	112,95
NrB *SC₂*	69,76±3,12	13÷133	16,15	44,95	5,76	9,61	**35,92**	4,96	**7,11**
GB *SC₁*	1,72±0,16	0÷5,6	1,47	1,50	70,47	71,29	**97,71**	2,47	**143,49**
GB *SC₂*	2,44±0,15	0,3÷5,6	0,28	0,34	21,70	24,01	81,62	0,99	40,38
MMB *SC₁*	26,25±1,25	0÷41,46	26,15	30,15	19,48	20,92	86,72	9,81	37,37
MMB *SC₂*	33,28±0,99	15,6÷52,32	27,62	29,85	15,79	16,42	92,53	10,42	31,29

Analizând rezultatele, 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 aceste caractere (h^2=97,98%, AG=112,95%) la somaclonele SC_1, ceea ce relevă efectele aditive în controlul acestor caractere prezintă o eficiență sporită în selecția genotipului după fenotip. Pentru somaclonele SC_2 valorile heritabilității s-au micșorat în comparație cu SC_1, menținând superioritate semnificativă față de martor.

Contribuția genotipului, mediului și a interacțiunii genotip x mediu este variabilă în exprimarea fenotipică a caracterelor cantitative. Varianțe genotipice și fenotipice majore sunt atestate pentru *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 SC_1 (Ingen 35) pentru *greutatea boabelor* (Vg=0,06; Vph=0,08) și *lungimea spicului principal* (Vg=0,57; Vph=0,64).

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 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 influență 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 [2, 8].

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 [6].

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 exercitat influență stimulatoare 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 necrotizându-se [1].

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%) [7].

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 [3].

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 [15].

8. Analiza variației 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.

9. Evaluarea variabilității molecular-genetice prin analiza RAPD-PCR a pus în evidență 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 [16].

10. Aprecierea variantei 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.

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

1. **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.
2. **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. Chișinău, 2021, pp. 127-130. ISBN 978-9975-56-912-5.
3. **CIOBANU, R.** Aspectul morfologic al regeneranţilor de triticale obţinuţi *in vitro* sub acţiunea radiaţiei gama. In: *Ştiinţele vieţii în dialogul generaţiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar şi de afaceri*: conferința șt.naț. cu participare intern., 21-22 oct. 2019. Chişinău, 2019, pp. 21-22. ISBN 978-9975-108-83-6.
4. **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 naț. (jubiliară) cu participare intern., 17-18 febr. 2005. Chișinău, 2005, pp. 149-152. ISBN 9975-64-034-6.
5. **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. Chișinău, 2014, pp. 189-193. ISBN 978-9975-56-912-5.
6. **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. Chișinău, 2020, pp. 170-175. ISBN 978-9975-56-177-8.

7. **CIOBANU, R.** Influența genotipului și 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.
8. **CIOBANU, R.** Influenta interactiunii factorilor "Genotip" – "Vârsta explantului" asupra frecventei calusogenezei la triticale. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective:* simpozion şt. naţ. cu participare intern., Ed. III, 24-25 oct. 2013. Chişinău, 2013, p. 16. ISBN 978-9975-159-81-4.
9. **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.
10. 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.
11. 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, pp. 325-333. ISBN 978-9975-111-161-1; ISBN 978-9975-56-560-8.
12. 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.
13. 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).
14. 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.
15. **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.
16. **CIOBANU, R.** The Assessment of Genetic Polymorphism in Triticale SC_1 Somaclones using RAPD - PCR Markers. In: *SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science.* 2023, vol. 10 (1), pp. 9-17. ISSN: 2394-2568.
17. FALCONER, D., MACKAY, F. Introduction to Quantitative Genetics. Longman, New York, 1996. 464p. ISBN 0-582-016428.
18. 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.
19. 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.
20. 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).
21. MULLINS, E., BRESSON, J., DALMAY, T., DEWHURST, I., EPSTEIN, M., FIRBANK, L. et al. *In vivo* and *in vitro* random mutagenesis techniques in plants. In: *EFSA Journal*. 2021, vol. 19(11), pp. 6611-6630. ISSN 1831-4732.
22. 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.
23. 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.
24. SINGH, R., CHAUDHARY, B. *Biometrical Methods in Quantitative Analysis. Kalayani Publishers*. New Delhi, 1985. 304 p. ISBN 978-8176633079.
25. 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.3rded. Rome, Italy, 2018, 301 p.
26. ULLAH, N., ULLAH, H., AFRIDI, K., ALAM, M., JADOON, S., et.al. 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).

27. 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.
28. 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.
29. НИКИТИНА, Е., ХЛЕБОВА, Л., ПРОНИНА, Р. Сомаклональная изменчивость *in vitro* как источник создания исходного материала для селекции мягкой пшеницы. In: *Acta Biologica Sibirica*. 2015, nr 3-4, pp. 171-185. ISSN 2412-1908 (online).
30. 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).

LISTA LUCRARILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice din străinătate recunoscute

1. **CIOBANU, Renata.** The Assessment of Genetic Polymorphism in Triticale SC1 Somaclones using RAPD-PCR Markers. In: *SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science* Volume 10 Issue 1, pp. 9-17, 2023, *Crossref,* ISSN: 2394-2568/

Articole în reviste științifice naționale acreditate (categoria B)

2. **CIOBANU, Renata.** Evaluarea variației somaclonale la plantele de triticale regenerate din embrioni maturi prin cultura *in vitro* și iradiere cu raze gama. In: *Studia Universitatis Moldaviae*, nr. 1, pp. 11-20, 2023. ISSN 1814-3237.

Articole în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

3. **CIOBANU, Renata**. Aprecierea potențialului morfogenetic și regenerativ al genotipurilor de triticale în cultura *in vitro*. In: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor* Conferința științifică internațională, Ed. 7, 4-5 octombrie 2021, Chişinău, 2021, pp. 127-130. ISBN 978-9975-56-912-5.
4. **CIOBANU, Renata**. Acţiunea razelor gama asupra masei calusale şi regenerării de plantule în cultura *in vitro* la triticale. In: *Agronomie şi agroecologie*. Vol. 52(1), 2018, Chişinău, 2018, pp. 358-363. ISBN 978-9975-64-301-6.
5. **CIOBANU, Renata**. Inducerea calusogenezei şi regenerării plantulelor din embrionii maturi la diferite genotipuri de triticale. In: *Genetica, fiziologia şi ameliorarea plantelor* Conferința științifică internațională, Ed. 5, 23-24 octombrie 2014, Chişinău. 2014, pp. 189-193. ISBN 978-9975-56-194-5.

Articole în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

6. **CIOBANU, Renata**; SÎROMEATNICOV, I.; COTENCO, E. Influența culturii *in vitro* asupra indicilor citogenetici la triticale. In: *Realizări ştiinţifice in ameliorare şi tehnologii inovative la culturile cerealiere în contextul schimbărilor climaterice* Conferința științifico -practică cu participare internațională, 4-5 septembrie 2020, Chişinău. 2020, pp. 170-175. ISBN 978-9975-56-177-8.
7. **CIOBANU, Renata**. Influenţa genotipului şi a razelor gama asupra regenerării de plantule în cultura *in vitro* la triticale. In: *Biodiversitatea în contextul schimbărilor climatice* Conferința științifică cu participare internațională, Ed. a 2-a, 23 noiembrie 2018, Chișinău, Republica Moldova: Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir", 2018, pp. 164-170. ISBN 978-9975-3178-9-4.
8. **CIOBANU, Renata**. Cercetări privind influența genotipului și a mediului de cultură asupra procesului de calusogeneză la triticale In: *Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei şi ameliorării* Conferința națională (jubiliară) cu participare internaţională, 17-18 februarie 2005, Chișinău, 2005, pp. 149-152. ISBN 9975-64-034-6.

Articole în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale

9. **CIOBANU, Renata**. Calusogeneza şi embriogeneza somatică la triticale. In: *Structura şi funcţionalitatea sistemelor biologice – diversitate şi universalitate* Conferinţa Ştiinţifică în memoria academicianului Boris Matienco, 17 noiembrie 2011, Chișinău, 2011, pp. 76-79. ISBN 978-9975-56-015-3.
10. **CIOBANU, Renata**. Studiul frecvenței calusogenezei la triticale în dependență de mediul de cultură și genotip. In: *Genetica şi ameliorarea plantelor, animalelor şi microorganismelor* Congresul VIII al Societăţii Geneticienilor şi Amelioratorilor din Republica Moldova, 29-30 septembrie 2005, Chișinău, 2005, pp. 468-473. ISBN 9975-78-427-5.

Teze în culegeri ştiinţifice în lucrările conferinţelor ştiinţifice internaţionale (Republica Moldova)

11. **CIOBANU, Renata.** Variability of biomorphological and quantitative characteristics of SC1 somaclones of triticale induced by gamma rays and *in vitro* culture. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective* Simpozion ştiinţific internaţional, Ed. a VI-a, 3-4 octombrie 2022, Chișinău, Republica Moldova, 2022, pp. 47-49. ISBN 978-9975-159-81-4.
12. **CIOBANU, Renata**. Evaluarea indicilor citogenetici la celulele calusale obţinute din embrioni maturi de triticale sub acţiunea radiaţiei gama. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective* Simpozion ştiinţific internaţional, Ed. a V-a, 21-22 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova, 2019, p. 13. ISBN 978-9975-56-695-7.

Teze în lucrările conferinţelor ştiinţifice naţionale cu participare internaţională

13. **CIOBANU, Renata**. Assessment of the morphogenetic and regenerative potential of triticale genotypes in *in vitro* culture. In: *Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community*, The National Conference with international participation. Ed. 2, 29-30 septembrie 2022, Chișinău, Republica Moldova: Moldova State University, 2022, pp. 32-33. ISBN 978-9975-159-80-7.
14. **CIOBANU, Renata**. Aspectul morfologic al regeneranţilor de triticale obţinuţi *in vitro* sub acţiunea radiaţiei gama. In: *Ştiinţele vieţii în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar şi de afaceri*, Conferința științifică națională cu participare internațională, 21-22 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova, 2019, pp. 21-22. ISBN 978-9975-108-83-6.
15. **CIOBANU, Renata**. Variabilitatea indusă de radiaţiile gama *in vitro* la triticale. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective,* Simpozion ştiinţific naţional cu participare internaţională, Ed. IV-a, 3-4 octombrie 2016, Chișinău, Republica Moldova: 2016, p. 71. ISBN 978-9975-56-371-0.
16. **CIOBANU, Renata**. Influenta interactiunii factorilor "Genotip" – "Vârsta explantului" asupra frecventei calusogenezei la triticale. In: *Biotehnologii avansate – realizări şi perspective* Simpozion ştiinţific naţional cu participare internaţională, Ed. a III-a, 24-25 octombrie 2013, Chișinău, Republica Moldova, 2013, p. 16. ISBN 978-9975-56-111-2.

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 şi recomandări, bibliografie din 380 titluri, 8 anexe, 123 pagini text de bază, 43 figuri, 31 tabele. Rezultatele obţinute sunt publicate în 16 lucrări ştiinţifice.

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 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.

Noutatea şi originalitatea ştiinţifică. 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 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 crearea de noi somaclone cu randamente sporite.

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. 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 ştiinţifice. 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.

CIOBANU RENATA

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

162.01. Genetică vegetală

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 17.11.2023	Formatul hârtiei A4
Hârtie ofset. Tipar digital	Tiraj 50 ex.
Coli de tipar: 3.00	Comanda nr. 171

Tipografia PRINT-CARO

str. Columna, 170

tel.: 022-85-33-86