

GENETICĂ ȘI AMELIORAREA PLANTELOR

**REALIZĂRI ÎN DOMENIUL BIOTEHNOLOGIEI
VEGETALE**

MARIAN VERZEA, FLORENTINA RĂDUCANU

Biotehnologiile moderne constituie o achiziție cu valoare fundamentală și aplicativă a științei contemporane. Odată cu dezvoltarea cunoștințelor de biologie celulară, genetică moleculară, biochimie, biofizică, microbiologie și inginerie genetică, a devenit posibilă manipularea artificială a informației genetice a organismelor vii și, pe această bază, au apărut biotehnologiile moderne cu implicații deosebite în ameliorarea plantelor și animalelor, în producerea de substanțe farmaceutice și cosmetice, de produse chimice și bioenergetice valoroase. Biotehnologiile sunt privite ca mijloace sigure de înfruntare a problemelor alimentare, energetice, asigurarea resurselor de materie primă și ecologice. Biotehnologia reprezintă una din direcțiile prioritare în numeroase țări pentru obținerea produselor clasice industriale (antibiotice, vaccinuri, factori alergeni, drojdii alimentare, aminoacizi, enzime etc.), conservarea germoplasmei, testarea, selecția, micromultiplicarea și propagarea variabilității utile, diagnosticarea, profilaxia și tratamentul unor boli cu ajutorul microorganismelor și al celulelor animale și vegetale (inclusiv al celor obținute prin metode de inginerie genetică și celulare), componentelor celulelor și al protoplaștilor de biosinteză, al enzimelor și al agenților biologici imobilizați (substraturile și produsele rezultate din procesele biotehnologice cum ar fi: îngrășămintele bacteriene și mijloace de protecția plantelor, hormoni și alte produse ale biotransformării, acizi organici, polizaharide, preparate proteice etc.).

Principalele direcții de dezvoltare a biotehnologiilor sunt condiționate, pe de o parte, de cerința în anumite produse și energie concomitent cu acumulările cantitative de materii prime neutilizabile, inclusiv de deșeuri, iar pe de altă parte, de apariția noilor descoperiri în cercetarea fundamentală.

Biotehnologiile contemporane au implicații cu totul deosebite în agricultură și industria alimentară, în medicină și industria farmaceutică, în industria chimică și metalurgică, în valorificarea biomasei și producerea de energie neconvențională etc.

În agricultură, prin aplicarea metodelor *in vitro* (embriocultura, embriogeneza, androgeneza, ginogeneza, hibridare somatică), au fost obținute, la aproape toate speciile agricole, plante libere de viroze, multiplicarea genotipurilor rare, somaclone valoroase, plante haploide care contribuie la scurtarea procesului de ameliorare pentru rezistența la diferiți factori de stres sau pentru îmbunătățirea

unor caractere calitative. Transferul unor caractere agronomice utile de la speciile sălbatice la cele cultivate se poate realiza prin hibridare somatică (fuziunea de protoplaști), cunoscut fiind faptul că încrucișarea sexuată convențională între specii sau genuri diferite este dificilă datorită incompatibilității.

Scurt istoric al cercetărilor de biotehnologie vegetală la I.N.C.D.A. Fundulea

Cultura de țesuturi și celule vegetale ca problematică nouă își are începutul în țara noastră în anul 1975, iar la Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea, în 1976.

După o perioadă de cercetări metodologice, au fost obținute cu succes culturi de calus și regenerarea plantelor din celule somatice la principalele specii de cereale, plante tehnice și furajere.

Cercetările privind extinderea capacității de fixare a azotului atmosferic la plante neleguminoase (cereale și plante tehnice) au debutat în anul 1977, cu studiul unor asociații fixatoare de azot, între rădăcinile plantelor și microorganismele diazotrofe, capabile să furnizeze partenerului vegetal azot asimilabil și fitohormoni (P a p a c o s t e a și P o p e s c u , 1977). Ca rezultat al unui număr mare de experiențe, a fost elaborat un mediu original de cultură (H u r d u c și colab., 1980), și s-au obținut culturi stabile de calus la mai multe specii de cereale și graminee furajere (grâu, triticales, orz, porumb, *Elymus* sp., raigras), atât din țesuturi somatice, cât și din polen. S-a reușit, de asemenea, inducerea și menținerea de culturi stabile de calus la floarea-soarelui, lucernă și soia.

Un interes deosebit a fost acordat simbiozelor asociative la porumb, grâu și graminee cu bacteriile din genul *Azospirillum*, demonstrându-se faptul că aceste sisteme plastice sunt condiționate în special de genotipul plantei și agrofond.

În scopul ameliorării acestor simbioze asociative naturale (rizogeneză diazotrofe) a fost urmărită reacția diferitelor genotipuri de porumb și de grâu la inocularea experimentală cu mai multe tulpini bacteriene. Concomitent, s-a studiat modul în care asociațiile bacteriene au asigurat parțial necesarul de azot prin procesul de fixare biologică, precum și aportul la creșterea producției (P o p e s c u și colab., 1981). Paralel cu aceste cercetări au fost inițiate din anul 1981 și lucrări de transfer de informație genetică *nif* la plante neleguminoase (P o p a și P o p e s c u , 1983).

Regenerarea plantelor din țesuturi cultivate s-a realizat cu randament satisfăcător atât pe calea embriogenezei somatice, cât și prin organogeneză somatică, la următoarele specii: *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticale*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Zea mays* și *Lolium multiflorum*, selecționându-se dintr-un inocul inițial linii din calus embriogen din care s-au regerat ulterior un număr mare de plante la grâu și raigras (P a l a d a , 1984 b).

În programele de ameliorare, se remarcă în mod deosebit lucrările privind androgenza la orez și triticales (V e r z e a , și colab., 1982). Pe această cale, plante haploide și dublu haploide (DH) sunt utilizate în programele de ameliorare pentru crearea de noi soiuri de orez și triticales. Avantajele aplicării metodei androgenzei experimentale se regăsesc în: scurtarea procesului de ameli-

orare cu 5-6 ani prin realizarea homozigoției într-o singură generație, evidențierea genelor recesive, exprimarea plasmagenelor paterne, homozigoție totală, soiuri uniforme, mare diversitate genetică și creșterea eficienței procesului de selecție.

În anul 1989, P a l d a și colaboratorii au efectuat studii privind optimizarea culturii anterelor și obținerii haploizilor și dubluhaploizilor prin androgenză la grâu, triticales și orez. La grâu au fost identificate două surse genetice cu capacitate androgenetică și s-au obținut plante homozigote fertile într-o singură generație la toate cele trei specii de cereale investigate.

O altă aplicație a culturii *in vitro* este micromultiplicarea clonală a unor genotipuri valoroase. Acest procedeu a fost folosit la raigrasul aristat în scopul constituirii câmpului de clone al laboratorului de ameliorare a gramineelor furajere. Prin această metodă biotehologică, în anii 1984-1985 au fost multiplicat 201 genotipuri realizându-se câmpul de clone de circa 2000 plante anual. Tot în această perioadă a fost efectuată micropropagarea *in vitro* – metoda meristemelor și a calusurilor meristemice – pentru obținerea plantelor de lucernă libere de *Fusarium* (Ț e r b e a și I t t u, 1984).

V e r z e a (1989, 1990), folosind tehnica „*embryo rescue*” pentru obținerea hibridilor grâu x secară, a concluzionat că metoda aplicată constituie o cale eficientă de obținere a plantelor viabile F_1 .

În anul 1991, P a p a și colaboratorii au efectuat cercetări în scopul testării potențialului regenerativ în cultura de durată (*long term culture*) la 21 genotipuri de grâu, constatând că intensitatea procesului de variabilitate somaclonală este direct proporțională cu durata culturii. A fost, de asemenea, evaluată variabilitatea cromozomală a calusurilor neregenerative menținute timp de 150 zile prin subculturi repetate. Rezultatele studiului au evidențiat faptul că la unele linii pierderea capacității embriogene este asociată cu variații numerice și structurale ale cromozomilor, prezente în celulele calusale cu frecvență vizibilă în funcție de genotip.

V e r z e a și colaboratorii (1992) au efectuat numeroase cercetări cu privire la utilizarea androgenezei experimentale la formele hexaploide de triticales și rolul unor factori implicați în obținerea plantelor cu origine polinică. S-a concluzionat că în germoplasma speciei triticale de la I.N.C.D.A. Fundulea există gene care conferă capacitatea de a parcurge androgenza *in vitro*. Încrucișarea unor linii și soiuri care posedă această capacitate conduce la obținerea unor hibridi la care se manifestă efectul heterozis pentru acest caracter. În prezent, se obțin anual prin androgenză în medie 2000 plante haploide, care sunt utilizate în programul de ameliorare al speciei *Triticale*.

Cercetările de androgenză la forme hexaploide de triticales (B a d e a și colab., 1992) au avut drept scop stabilirea influenței mediilor de cultură și a genotipului asupra abilității androgenetice. S-au folosit cinci forme de triticales și 20 hibridi F_1 obținuți din încrucișarea lor. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că încrucișarea unor linii și soiuri care posedă capacitate androgenetică ridicată conduce la obținerea de hibridi la care se manifestă efectul heterozis pentru acest caracter.

Cealâcu și colaboratorii (1992) au efectuat studii referitoare la controlul biochimic al embriogenezei somatice la lucernă și au evidențiat specificitatea de soi și de tip de explant a peroxidazei la trei soiuri cu potențial embriogen diferit. Din țesuturile cultivate *in vitro* au fost identificate două tipuri de zimograme caracteristice pentru calusul embriogen, respectiv neembriogen.

În 1993, Verzea și colaboratorii au studiat embriogeneza somatică la formele parentale și hibrizi F_1 rezultați din încrucișări dialele (6 x 6) la triticales 6x, în vederea identificării genotipurilor hexaploide care să posede capacitate androgenetică ridicată și acumularea unor date care să contribuie la elucidarea unor aspecte privind determinismul genetic al abilității androgenetice. S-a constatat că performanța *per se* a părinților nu este reflectată într-o performanță similară la combinațiile hibride în care sunt implicate. Selecția părinților pentru programul de încrucișări trebuie efectuată pe baza analizei capacității lor de combinare. Diferențele mari obținute în privința valorilor înregistrate la hibridii reciproci sugerează ideea influenței citoplasmei asupra intensității exprimării diferitelor componente ale capacității androgenetice.

Primele informații privind rezistența la nivel celular la stresul salin, la lucernă, au fost furnizate de către Cealâcu și Varga (1994), care au raportat obținerea de linii celulare tolerante la salinitate. Studii ulterioare efectuate la nivel biochimic (activitatea peroxidazei, chitinazei și conținut în prolină) au evidențiat o creștere a toleranței la salinitate a plantelor generației R_1 .

Prin metode biotehnologice (utilizând selecția *in vitro* la nivel celular) și metode clasice de ameliorare, a fost creat soiul Sigma, soi cu însușiri superioare de producție și calitate superioară a furajului (distinctivitate, stabilitate, omogenitate) față de soiurile martor Adonis și Selena (Varga și colab., 1994).

Moraru și Răducanu (1994) au efectuat studii privind cultura de antere la specia *Triticum aestivum*, luând în studiu 10 genotipuri de grâu de toamnă create în România, 5 dintre ele fiind cunoscute ca fiind purtătoare ale translocației 1B/1R. S-a constatat că genotipurile purtătoare ale translocației 1B/1R au manifestat o pretabilitate superioară, asigurată statistic, la toți parametrii studiați, iar frecvența plantelor verzi/100 antere cultivate au fost semnificativ corelate cu frecvența anterelor cu răspuns și rata regenerării, dar nu și cu producția de embrioizi și frecvența plantelor albinotice.

La grâu și triticales (Moraru și colab., 1994) au fost investigați diferiți agenți selectivi (NaCl, PEG și ABA), în vederea testării și selecției pentru rezistența la diferiți factori abiotici de stres (salinitate, stres termic/hidric). A fost evidențiată existența corelațiilor pozitive între reacția genotipurilor în condiții *in vitro*, în prezența agenților selectivi și comportamentul plantelor în condiții de stres de aceeași natură, *in vivo*.

În perioada 1994-1996, au fost efectuate studii privind elaborarea unor metode de testare și selecție *in vitro* pentru rezistența florii-soarelui față de patogenii *Sclerotinia sclerotiorum* și *Phomopsis helianthi*.

Rezultatele acestor studii s-au concretizat prin elaborarea a două metode eficiente de testare/selecție a materialului de ameliorare, utilizând embriocultura și drept agent selectiv filtratul patogenilor respectivi.

În ceea ce privește metoda de testare a florii-soarelui pentru rezistența la patogenul *Phomopsis helianthi*, aceasta este o metodă relativ mai ușor de efectuat

(deoarece acest patogen, spre deosebire de *Sclerotinia*, nu manifestă forme de atac diferite și control genetic diferit (în funcție de forma de atac), este sigură și rapidă, putându-se afla gradul de toleranță al materialului de ameliorare în maximum 21 de zile. Pentru *Sclerotinia sclerotiorum* se recomandă utilizarea amestecurilor de filtrate, atât după forma de atac, dar și din zone ecologice diferite, deoarece din aceste studii s-a observat că virulența este influențată și de factorii de mediu, în funcție de zona ecologică de unde s-a prelevat izolatul (Răducanu, 1996).

În 1992, 1994, 1996, Maxim și colaboratorii au efectuat studii privind capacitatea de regenerare *in vitro* la peste 40 de soiuri și linii de orz și orzoaică de toamnă, utilizând ca explante embrioni imaturi. Au fost identificate linii cu înalt potențial embriogen și capacitate de regenerare. De asemenea, au fost identificate genotipuri de porumb cu capacitate mare de regenerare *in vitro*. Aceiași autori au efectuat studii privind toleranța la ioni de Al^{3+} a calusului neembriogen/embriogen de orz și orzoaică. S-a constatat că variația greutateii calusului după perioada de selecție a fost corelată cu tipul de calus utilizat, calusul neembriogen înregistrând modificări minime, deoarece situsul activ de fixare a ionilor de Al^{3+} este reprezentat de membranele celulare și nucleele celulelor în diviziune activă.

Rezultate ale unui studiu privind potențialul embriogen la unele genotipuri de grâu comun, linii și soiuri românești și străine, în care s-a urmărit identificarea tipurilor de calus embriogen și stabilirea unor parametri cantitativi, precum și expresia izoenzimelor peroxidaza și esteraza în timpul embriogenezei somatice au fost raportate de Cealăcu și colaboratorii (1996). Autorii au observat că tipul de calus embriogen, prezent cu frecvența cea mai mare, pe parcursul embriogenezei somatice, a fost calusul de tip II cf. nomenclaturii TCA, iar în urma analizei electroforetice a peroxidazei și esterazei, s-a constatat că acestea sunt caracteristice fiecărui genotip. Calusurile embriogene au exprimat un număr mai mare de izoperoxidaze iar esteraza a prezentat un polimorfism mai accentuat comparativ cu peroxidaza. Variabilitatea manifestată de către peroxidază sugerează faptul că această enzimă poate fi considerată drept marker al capacității embriogenetice în cultura *in vitro*, la grâul comun.

În scopul evaluării variației induse la nivelul locilor care codifică gluteninele cu greutate moleculară mare (beta-amilaza și fosfataza acidă), ca urmare a regenerării din calusuri cu origine diferită: microspori și embrioni imaturi, Hagioma și colaboratorii (1996) au efectuat cercetări, folosind ca material biologic o linie DH de *Triticum aestivum*, obținută prin dihaploidizarea unui haploid obținut prin cultura de antere, selecționat pentru aptitudine androgenetică. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că numărul, frecvența și amplitudinea variațiilor generate de cultura *in vitro* la nivelul markerilor biochimici studiați au avut valori diferite, în funcție de locii implicați în biosinteza componentelor respective și de originea calusului utilizat. Atât la gametoclone, cât și la somaclone a fost înregistrat un singur tip de modificare a compoziției în subunități gluteninice. În schimb, la gametoclone s-au obținut două noi tipuri de enzimograme pentru beta-amilază, iar la somaclone s-au conturat cinci tipuri de enzimograme. În cazul fosfatazei acide nu au fost evidențiate modificări induse ca urmare a

culturii *in vitro* sau a regenerării. Regenerarea din calusuri, prin androgeneză, a determinat o frecvență mai mare a variațiilor pentru subunitățile glutanice cu greutate moleculară mare, în timp ce regenerarea din calusuri cu origine în embrioni imaturi a indus o frecvență mai mare a variațiilor enzimogramei beta-amilazei.

Unele rezultate preliminare obținute în urma hibridărilor interspecifice între speciile *Phaseolus vulgare* și *Phaseolus acutifolius*, în vederea diversificării materialului inițial de ameliorare a fasolei cultivate pentru rezistența la arșiță, au fost raportate de Dinică și Răducanu (1996). Astfel, specia cultivată a fost folosită ca formă maternă iar specia sălbatică, purtatoarea genelor de rezistență la arșiță, ca formă paternă. Datorită incompatibilității între specii, s-a apelat la tehnica de salvare a embrionilor la 15 zile de la efectuarea hibridărilor. Folosind embriocultura au fost obținute plante hibride viabile.

Moraru și colaboratorii (1997) au efectuat un studiu, utilizând ca agent selectiv toxina sintetică ZEN (Zearalenone), embriocultura ca metodă *in vitro*, 5 genotipuri de grâu de toamnă și 3 linii consangvinizate de porumb ca material biologic. Rezultatele studiului au evidențiat faptul că utilizarea toxinei ZEN a determinat o reducere a greutateii calusului la toate soiurile de grâu, comparativ cu varianta martor. Reduceri asigurate statistic s-au înregistrat numai la genotipurile care au manifestat rezistență scăzută și la testarea în condiții de câmp.

Un studiu privind frecvența inducției de calus embriogen din cultura *in vitro* a embrionilor imaturi, la cinci specii de cereale de toamnă (grâu comun, grâu durum, triticales 6x, triticales 8x și secara), a evidențiat rolul primordial pe care îl ocupă genotipul, în ceea ce privește frecvența inducției de calus embriogen, la toate cele cinci specii de cereale folosite în studiu. Valori relativ mari ale potențialului embriogen au fost obținute la genotipurile de grâu comun, triticales 8x și triticales 6x. La genotipurile de grâu durum și mai ales la cele de secară au fost înregistrate valori reduse ale frecvenței inducției de calus embriogen (Verzea și Cealăcu, 1997).

Cercetările întreprinse de Maxim (1998) au demonstrat faptul că utilizarea androgenezei în ameliorarea orzului și orzoaicei a fost limitată din cel puțin trei considerente: obținerea unui procent relativ scăzut de plante verzi, influența mare a genotipului asupra răspunsului androgenetic și costul ridicat al mediului de cultură cu Ficoll.

Eficiența culturii de antere la specia triticales este, în general, mai mică decât la grâu, în special datorită ratei scăzute de regenerare de plante verzi. În vederea testării potențialului embriogenetic, Verzea (1998) a inițiat un studiu pe 11 combinații hibride F1 de triticales, folosite în programul de ameliorare de la I.N.C.D.A. Fundulea. În urma efectuării acestui studiu au fost identificate cinci combinații hibride F1 de triticales hexaploide, cu valori ale frecvenței regenerării plantelor androgenetice de peste două plante verzi la 100 antere cultivate. Randamentul culturii de antere la formele hexaploide de triticales poate fi mărit semnificativ, prin reducerea substanțială a numărului de plante albinotice regenerate.

În vederea îmbunătățirii performanțelor tehnicii de cultură a anterelor *in vitro* la grâu comun, Verzea (1998) a efectuat un studiu utilizând un sistem de selecție în trepte. Pentru regenerare s-au folosit trei medii de cultură: Pauk și colab. (1991); Zhung și Hu (1983) și Chu (1978). Plantele obținute de pe

oricare din aceste medii au fost transferate în vederea înrădăcinării pe mediul N6-1, suplimentat cu 2,0 mg AIA /l. S-a remarcat faptul că în treapta a doua și a treia de regenerare s-a obținut un număr mai mare de plante decât la prima treaptă și au fost identificate câteva combinații hibride F1, cu valori de 8,4-18,3 plante verzi la 100 antere cultivate.

În scopul evaluării variabilității genetice a florii-soarelui față de patogenul *Sclerotinia sclerotiorum* precum și studiul relației dintre simptomele morfologice, conținutul de acid oxalic și activitatea enzimei SKDH, Răducanu și colab. (1999) au efectuat un studiu pe patru hibridi de floarea-soarelui cu niveluri cunoscute de rezistență față de acest patogen. Plantule obținute aseptice din germinarea embrionilor imaturi au fost transferate în soluții hidroponice, suplimentate cu filtrate de *Sclerotinia*, și au fost menținute timp de 28 zile în condiții controlate. Analiza varianței pentru parametrii conținut de acid oxalic și activitatea enzimei SKDH, la variana martor, a evidențiat diferențe asigurate statistic, dar nu și între genotipuri, pentru caracterele: înălțimea plantei, diametrul bazei tulpinii, greutatea proaspătă a capitulului. La cele două variante de tratament s-au semnalat scăderi semnificative pentru toți parametrii studiați; acest fapt ar putea înlesni selecția timpurie a genotipurilor rezistente la acest patogen.

Maxim și Băgiu (1999) au analizat 11 genotipuri de porumb, folosind ca explante embrioni imaturi (16-18 zile de la polenizare), în vederea identificării acestora cu aptitudini embriogene, în scopul introducerii lor în programul de ameliorare la diferiți factori de stres. Au fost identificate patru genotipuri care au format embrioi cu simetrie bilaterală, asemănătoare celor zigotici, pe mediu de cultură suplimentat cu sorbitol.

În practica ameliorării curente ca și pentru cercetările moderne de genetică, generații haploide de plante se obțin prin utilizarea a două categorii de metode biotehnologice; metode bazate pe embriogeneză somatică (androgeneza, microsporogeneza și ginogeneza) și metode bazate pe embriogeneză zigotică (zigoti produși prin hibridarea îndepărtată, urmată de eliminarea genomului partenerului polinic și «salvarea embrionului haploid» prin cultură *in vitro*).

Prin ambele categorii de metode se realizează următoarele:

- fixarea variabilității genetice utile după primele cicluri de recombinare (F1, F2, F3) prin homozigotare completă într-o singură generație;
- accelerarea și creșterea eficienței selecției (corespondență perfectă/fenotip);
- reducerea semnificativă (5-6 ani) a perioadei de obținere de noi soiuri;
- soiurile cu origine dublu haploidă corespund întru totul criteriilor de diversitate, uniformitate și stabilitate genetică (DUS) impuse de UE.

Pe de altă parte, cerințele aplicării cu succes a unui sistem biotehologic de producere de linii DH sunt reprezentate prin: obținerea unui număr cât mai mare de linii DH la cât mai multe genotipuri de interes; tehnologia sistemului să nu determine variații somaclonale *in vitro* (variabilitate intralinie) și liniile DH cu origine în aceeași combinație hibridă să manifeste o gamă cât mai largă de variabilitate genetică.

În cercetările moderne de genetică haploizii și populațiile DH constituie materiale biologice ideale pentru o arie largă de domenii: inducerea de mutații la nivel haploid; studii de genomică și proteomică (analize cu markeri moleculari și analize QTL, hartare genetică); introgresia de gene utile din germoplasma sălbatică; transformarea genetică la nivel haploid etc.

La I.N.C.D.A. Fundulea s-au inițiat în 1991 cercetări privind aplicarea sistemelor biotehnologice *Zea* și *Bulbosum* pentru inducerea de haploizi și obținere de linii DH la grâul comun, grâul durum și triticale, respectiv la orzul și orzoaica de toamnă și primavară și la orzul golaș (G i u r a și M i h ă i l e s c u, 2000).

Stabilirea protocolului de lucru pentru utilizarea celor două sisteme în condiții experimentale suboptimale (seră) s-a realizat pe durata mai multor cicluri de hibridare și a determinat creșteri semnificative ale ratelor de succes pentru fiecare din cele 12 faze de lucru ale protocolului (G i u r a, 1993, 1998, 2006; M i h ă i l e s c u și colab., 1993, 1994, 1995).

La grâul comun (*Triticum aestivum* L.), îmbunătățirile aduse protocolului de lucru au condus la creșterea valorilor componentelor ce definesc eficiența producerii de haploizi prin sistemul *Zea*. Astfel, numărul de cariopse formate pe spic lucrat s-a dublat, ajungând de la o valoare medie de 9,2 în 1991 la 18,8 în 2002 și 16,5 în 2005, iar valoarea medie de embrioni la 100 flori polenizate a crescut de la 8,0 în 1991 la 24,7 în 2002 și, respectiv, 24,1 în 2005. În perioada 1991-2005 în programul producerii de haploizi pentru ameliorarea grâului comun au fost cuprinse 265 combinații hibride F1 de la care s-au obținut 58339 embioni haploizi, din care s-au cultivat *in vitro* peste 50.000 embrioni. În medie, la grâul comun s-au produs în ultimii ani între 1500 și 2000 linii dublu haploide într-un singur ciclu anual de hibridare grâu x porumb, de 30-40 zile.

La grâul durum (*Triticum durum* L.) și triticale încercările de aplicare a sistemului *Zea* au fost pentru început relativ neconcludente din cauza răspusurilor genotipice foarte diferențiate, cele două specii fiind considerate uneori refractare la aplicarea sistemului *Zea*.

Îmbunătățirea procedeeleor de hibridare ca și aplicarea unor combinații hormonale specifice au condus la creșterea eficienței producerii de haploizi la aceste două specii (G i u r a, 2007). Numărul mediu de cariopse formate/spic la grâul durum a crescut de la 11,0 în 1996 la 15,4 în 2004, iar valorile procentuale ale embrionilor haploizi din florile polenizate a variat de la 6,6 în 1996 la 16,7 în 2004. În cazul speciei triticale numărul mediu de cariopse formate pe spic a crescut de la 9,6 în 1995 la 15,6 în 2004 iar procentul embrionilor haploizi din florile polenizate de la 6,4 la respectiv 11,9. Este de așteptat ca perfecționarea protocolului de lucru să permită introducerea curentă a sistemului *Zea* în practica ameliorării și la aceste două specii. Primul soi de grâu durum, GRANDUR, obținut prin aplicarea sistemului *Zea*, a fost înregistrat în 2005, iar primele soiuri de grâu comun, FAUR și GLOSA, cu origine haploidă, au fost înregistrate în 2004, respectiv, 2005.

La orz, valorile medii anuale ale parametrilor componenți ai eficienței producerii de haploizi (HPE) au crescut constant, reușindu-se obținerea de haploizi și linii DH la scară industrială. La orzul și orzoaica de toamnă valorile medii pentru capacitatea de regenerare *in vitro* de plante haploide (exprimată prin numărul de haploizi regenerați la 100 embrioni cultivați) au fost cuprinse între 4,7 (1992) și 41,1(1999). Eficiența producerii de haploizi (numărul de haploizi la 100 flori polenizate) a crescut semnificativ de la 1,2 (1992) la 16,1 (2006) cu valori maxime de 25,7 la genotipuri de orzoaică de primavară, 27,4 la orzul de toamnă, 31,5 la orzoaica de toamnă și 36,6 la orzul golaș de primavară. Numărul de haploizi induși/spic lucrat a manifestat, de asemenea, o evoluție poziti-

vă. În perioada 1992–1998, valoarea medie pentru acest parametru a fost de 0,7 crescând până la 2,9 în 2003, iar valorile maxime au fost de 4,7 la orzoaica de primăvară, 6,7 la orzul de toamnă, 7,0 la orzoaica de toamnă și de 7,5 la orzul golaș (Mihăilescu și Giura, 1998; Giura și Mihăilescu, 2000).

Sistemul biotehlogic *Bulbosum* de inducere de haploizi și producere de linii DH a devenit, pe baza rezultatelor obținute, una din componentele principale ale programului de ameliorare a orzului. În medie, anual se produc între 500-800 linii DH linii de orz și orzoaică de toamnă incluse în testări preliminare în rețeaua I.N.C.D.A. Fundulea și în testări finale la I.S.T.I.S. (jumătate din liniile testate la I.S.T.I.S. au origine haploidă).

Programele de inducere de haploizi și producere de linii DH prin sistemele *Zea* și *Bulbosum* la grâul comun, grâul durum, triticales, orzul și orzoaica de toamnă și orzul golaș au fost incluse în Proiectele Naționale de Cercetare: AGRAL 314, AGRAL 353, BIOTECH 4545, AGRAL33, AGRAL 316 și CEEEX 2. În perioada 2003-2006 cercetările privind rezultatele aplicării sistemelor biotehnologice *Zea* și *Bulbosum* au fost încadrate în Acțiunea de Colaborare Europeană COST 851 («Gametic cells and molecular breeding for crops improvement»).

Începând cu anul 2001, în cadrul Colectivului de Biotehnologie au fost efectuate cercetări finanțate prin proiecte naționale. Astfel, Răducanu și echipa de cercetare (2001-2003) au efectuat cercetări privind posibilitățile de «Utilizare a tehnicilor *in vitro* în ameliorarea lucernei (*Medicago sativa* L.) pentru rezistența la excesul ionilor de aluminiu din sol» (Proiect BIOTECH. 60), iar Moraru și echipa au efectuat studii privind «Utilizarea metodelor biotehnologice pentru obținerea de genotipuri noi de grâu cu rezistență la stresul termic și hidric» (Proiect BIOTECH. 55). Ambele proiecte au avut ca obiectiv prioritar identificarea și selecția *in vitro* de genotipuri cu grade sporite de rezistență la factorii abiotici studiați, respectiv obținerea de somaclone de lucernă rezistente la aluminiu și linii de preameliorare la grâu. Materialul genetic astfel obținut a fost introdus în programele de ameliorare al speciilor studiate. Au fost obținute noi tehnologii de cultură și au fost îmbunătățite cele deja existente în vederea creșterii randamentului de regenerare și aclimatizare a plantelor la transferul de la condiții de cultură *in vitro* la cele *in vivo*.

Pentru perioada 2006-2008, se află în derulare proiectul «Studii avansate privind posibilitățile de prevenire a îmbolnăvirilor produse de unele specii toxigene de *Fusarium sp.* în lanțul trofic plante – animal – om», finanțat de Programul CEEEX, Agral 74, proiect care se vrea a fi un «preludiu» pentru accesarea de fonduri din cadrul programului FP7 (Răducanu și echipa de la I.N.C.D.A., parteneri: Universitatea Ovidius Constanța și I.N.C.D.O.C. Palas-Constanța).

RESULTS IN PLANT BIOTECHNOLOGY

Summary

In the practice of current breeding as well as modern genetic research, haploid generations are obtained by using two biotechnological method categories: one of them based on somatic embryogenesis (androgenesis, microsporogenesis and ginogenesis) and the other based on zygotic embryogenesis (zygotes produced by intergeneric crossing followed by the elimination of pollinic partner genome and “haploid embryo saving” by *in vitro* culture).

By both method categories, one can achieve:

- fixation of useful genetic variability after the first recombination cycles (F1, F2, F3) by complete homozygosity in one generation
- acceleration and increasing of selection efficiency (connection/phenotype)
- significant reduction (5-6 years) of period to obtain new varieties
- varieties with double haploid origin are in accordance with EU diversity, uniformity and genetic stability criteria (DUS)

The programs of haploid induction and double haploid lines production, by systems *Zea* and *Bulbosum* in common and durum wheat, triticale, winter, spring and naked barley were included in Research National Programs : AGRAL 314, AGRAL 353, BIOTECH 4545, AGRAL 33, AGRAL 316 and CEEX 2.

During 2003-2006, the research regarding the results of *Zea* and *Bulbosum* biotechnological system application were framed into COST 851 European Collaboration Action („Gametic cells and molecular breeding for crop improvement”).

Starting with 2001, research financed by National Projects were performed as part of Biotechnological team. Thus, Răducanu and research team (2001-2003) were performed research regarding the possibilities of "Using *in vitro* techniques in alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding for resistance to soil aluminum ion excess" (Project BIOTECH 60), and Moraru et al. were performed studies regarding „Using of biotechnological methods to obtain new winter wheat genotypes resistant to thermic and hydric stress" (Project BIOTECH 55).

Both project had as main aim the identification and *in vitro* selection of genotypes with increased resistance to studied abiotic factors as well as the obtainment of alfalfa somaclones resistant to aluminum and pre-breeding lines in wheat. The genetic material was introduced in breeding program of tested species. New crop technologies were obtained and the current ones were improved to increase the crop regeneration and acclimatization to transfer from *in vitro* to *in vivo* culture conditions.

For 2006-2008 period, the project „Advanced studies regarding the possibilities to prevent the diseases produced by some toxigenic species of *Fusarium* sp. in plant-animal-human chain", financed by Program CEEX, Agral 74, as an opportunity to access funds of FP7 Program (Răducanu and NARDI team, partners : University „Ovidius" Constanța and I.N.C.D.O.C. Palas - Constanța).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE SELECTIVE

- DINCĂ, VERONICA, RĂDUCANU, FLORENTINA, 1996 – *Preliminary results about interspecific crosses between P. vulgaris and P. acutifolius*. Romanian Agricultural Research, 5-6: 33-35, ISSN 1222-422.
- GIURA, A., 1993 – *Progress in wheat haploid production*. In: Proc 8th Int. Wheat Genet. Symp. Beijing, China, I: 741-745.
- GIURA, A., 1998 – *Wheat haploid production efficiency in wheat maize crosses*. In: Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement (Ed. T. Lelley), IFA, Tulln, Austria: 303-309.
- GIURA, A., 2006 – *Improvement of „Zea” system protocols for haploid induction in common wheat, durum wheat and triticale*. In: Book of Abstracts-Gametic Cells and Molecular Breeding for Crop Improvement: 50 (Cost Action 851, Vienna, Austria, 2006).
- GIURA, A., 2007 – *Haploid and doubled haploid lines production by „Zea” system in Triticum durum and triticale*. In: Cercetări științifice, Seria XI, Horticultură și Inginerie genetică, USAMVB Timișoara. Edit. Agroprint, Timișoara: 32-37.
- GIURA, A., MIHĂILESCU, ALEXANDRINA, 2000 – *Metode moderne de reducere a duratei programelor de ameliorare la grâu și orz*. In : Metode de cercetare în cultura plantelor. Edit. Agris, București: 17-36.
- HURDUC, N., PALADA, MAGDALENA, 1980 – *Rezultate privind obținerea și cultura îndelungată a calusului de grâu și orz*. Analele I.C.C.P.T., XLV: 437-443.
- MAXIM, P., DUȚĂ, ZOE, 1996 – *Aluminium tolerance of barley. Efficiency of in vivo procedures in estimation of genotypic difference*. Romanian Agricultural Research, 5-6: 21-29. ISSN 1222-4227.

- MIHĂILESCU, ALEXANDRINA, BUDE, A., GIURA, A., 1993 – *Reconsiderarea metodei Bulbosum alternativă de homozigotare rapidă a orzului cultivat*. Probleme de genetică teoretică și aplicată, XXV (1): 1-26.
- MIHĂILESCU, ALEXANDRINA, BUDE, A., GIURA, A., 1994 – *Increasing efficiency of barley haploid production by treatments with plant growth regular applied in vivo*. Romanian Agricultural Research, 1: 25-53.
- MIHĂILESCU, ALEXANDRINA, GIURA, A., 1995 – *Production of winter barley haploids by bulbosum system. I. Crossing compatibility between winter barley Romanian varieties and H. bulbosum*. Romanian Agricultural Research, 4: 1-9.
- MIHĂILESCU, ALEXANDRINA, GIURA, A., 1998 – *Sistemul biotehologic bulbosum la orz – 5 ani de aplicare la I.C.C.P.T. Fundulea*. Cercetări de genetică vegetală și animală, V: 93-120.
- MORARU, IRINA, RĂDUCANU, FLORENTINA, 1994 – *Response of the Romanian winter wheat genotypes to in vitro anthers culture*. Romanian Agricultural Research, 2: 13-19. ISSN 1222-4227.
- PALADA-NICOLAU, MAGDALENA, 1994 b – *Results concerning in vitro plant regeneration in cereals and grasses with possible uses in plant breeding*. Proceedings of the Int. Symp. Plant tissue and cell culture application to crop improvement: 439.
- PAPACOSTEA, P., POPESCU, ANA, 1977 – *Cercetări asupra rizosferei unor graminee din flora spontană*. Al XIV-lea Simpozion de biologia solului, Cluj-Napoca, 11-13 noiembrie.
- POPA, L.M., POPESCU, ANA, 1983 – *Progrese în ingineria genetică aplicată în agricultură*. Probleme de genetică teoretică și aplicată, XII, 1: 881-102.
- POPESCU, ANA, HERA, CR., PAPACOSTEA, P., BURCEA, MIHAELA, HURDUC, N., SARCA, TR., BURLACU, GH., 1981 – *Cercetări privind asociațiile de bacterii fixatoare de azot la unele plante neleguminoase*. Anale I.C.C.P.T., XLVIII: 529-544.
- VARGA, P., BADEA, ELENA MARCELA, SCHITEA, MARIA, MARTURA, T., 1994 – *„Sigma” – the first alfalfa cultivar composed exclusively of somaclones*. Romanian Agricultural Research, 2: 73-77. ISSN 1222-422.
- VERZEA, M., 1998 – *Inducerea de calus și regenerare de plante din cultura de antere la hibridii F1 de grâu comun (Triticum aestivum)*. Cercetări de genetică vegetală și animală: 137-149.
- VERZEA, M., PALADA, MAGDALENA, POPESCU, ANA, 1987 – *Prezent și perspective în cercetările de biotehologie și inginerie genetică*. Analele I.C.C.P.T., LV: 26-38.
- VERZEA, M., BADEA, ELENA, PALADA, MAGDALENA, MORARU, IRINA, RĂDUCANU, FLORENTINA, 1993 – *Cultura de celule și țesuturi vegetale în ameliorarea cerealelor, plantelor tehnice și furajere*. Lucrări Științifice, XXVI I, partea II. Agronomie, USAMVB Timișoara: 138-142.
- VERZEA, M., BADEA, ELENA, LUPUȘANCI, ELENA, MORARU, IRINA, RĂDUCANU, FLORENTINA 1994 – *Efectul genotipurilor parentale asupra capacității androgenetice la hibridii F1 de triticale 6x*. Cercetări de genetică vegetală și animală, IV: 55-62.
- VERZEA, M., RĂDUCANU, FLORENTINA, BALDINI, M., RARANCIUC, STELUȚA, MORARU, IRINA, 2003 – *Evaluarea variabilității genetice a unor genotipuri de floarea-soarelui față de Sclerotinia sclerotiorum prin diferite teste de rezistență și analize AFLP*. Probleme de genetică teoretică și aplicată: 35-45, ISSN-1016-4871.
- RĂDUCANU, FLORENTINA, 1998 – *The using of cells and tissues cultures in sunflower breeding for Sclerotinia sclerotiorum and Phomopsis helianthi resistance*. Sunflower year book: 83-84, ISSN 1025-6024. (Doctoral Thesis), ISA, France.
- RĂDUCANU, FLORENTINA, VRÂNCEANU, A.V., PĂCUREANU, MARIA, 2000 – *Studies about the influence of Sclerotinia sclerotiorum filtrate on some quantitative and qualitative traits in Romanian sunflower genotypes in vitro and in vivo tested*. Proceeding of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse: K29 - K34.
- RĂDUCANU, FLORENTINA, PETCU, ELENA, MORARU, IRINA, 2004 – *Rezultate preliminare privind utilizarea tehnicilor neconvenționale în ameliorarea lucernei (Medicago sativa) pentru rezistența la toxicitatea ionilor de aluminiu și la aciditate*. Probleme de genetică teoretică și aplicată, 1-2: 31-45.