

## ROLUL GENOTIPULUI MATERN ÎN DETERMINAREA CAPACITĂȚII EMBRIOGENE LA MOLID

GHIȚĂ Gențiana\*, PALADA-NICOLAU Magdalena\*\*

**Rezumat:** Cercetările efectuate asupra rolului genotipului matern în determinarea capacității embriogene la molid au evidențiat faptul că acesta este mai puțin important decât s-a presupus inițial în cazul populațiilor prelucrate. Rezultă că materialul poate fi multiplicat prin embriogeneză somatică, cu o metodă optimizată și un număr de explante adecvat fiecărui genotip matern.

**Cuvinte cheie:** *Picea abies* (L.) Karsten, genotip matern, capacitate embriogenă, inducție embriogenă, confirmare, stabilizare, selecție de linii embriogene.

### Introducere

Embriogeneza somatică la molid a fost realizată pentru prima dată în 1985 de către Hakman. Ca urmare a perfecționării metodologiei, embriogeneza somatică la molid poate fi considerată deja ca o metodă de înmulțire vegetativă cu randament foarte ridicat și cu perspective pentru propagarea în masă. Există însă și unele limite. Principala limită este restrângerea sursei de țesut embriogen la explante juvenile, ceea ce face dificilă propagarea clonală, iar în ameliorare, impune existența unor criterii de markeri precoce de selecție. Dintre specii mai recalcitrante s-au dovedit a fi *Picea sitchensis* și *Picea pungens*.

Pentru a face metoda embriogenezei somatice o cale de multiplicare clonală rapidă și rentabilă mai trebuie perfecționate unele procedee metodologice, legate atât de cantitatea de material manipulat cât și de manopera umană.

Obiectivul acestei lucrări constă în evidențierea unor diferențe între genotipuri maternelle sub aspectul capacității embriogene.

Nivelurile la care s-au evidențiat aceste diferențe între genotipurile maternelle, din punct de vedere al capacității embriogene, sunt: inducția embriogenă, confirmarea, stabilizarea și selecția de linii embriogene.

### Material și metodă

Materialul biologic a fost reprezentat de semințe de molid provenite de la 10 arbori (mamă) în polenizare liberă, din aceeași populație și de două seturi de semințe de molid provenite de la părinți în polenizare liberă și hibridi reciproci.

Semințele de molid au fost supuse unui tratament de dezinfecție superficială în  $HgCl_2$  și apoi lăsate în a 4-a baie de apă distilată sterilă, timp de 4 ore pentru îmbibare. Cele ce se scufundă au fost disecate sub lupa stereomicroscopică, în nișa cu flux laminar, pentru a preleva embrionii somatici maturi.

Mediile de cultură cele mai indicate în cazul embriogenezei somatice la molid sunt:

- mediul pentru inducție (Murashige & Skoog 1962) cu fitohormoni 2,4D (acid 2,4-diclorofenoxiacetic) 10 $\mu$ M/l și BAP (6- benzil aminopurina) 1 $\mu$ M/l.

\* Facultatea de Biologie, Universitatea din București, Aleea Portocalelor 1-3, RO-76258-București

\*\* Parcul Dendrologic Simeria

- mediul pentru multiplicarea țesutului embriogen GD<sub>X</sub> (Gupta, Durzan & Funke 1987) cu 2-4D 1 μM<sub>l</sub>, BAP 2,2 μM<sub>l</sub> și kintină 2,2 μM<sub>l</sub>.

Pentru fiecare nivel subculturile sunt în număr variabil și de durată diferită:

- pe mediul de inducție au fost realizate 3 subculturi de 21-30 zile;
- pe mediul de multiplicare au fost realizate 1-5 subculturi pentru purificare, 2-5 subculturi pentru stabilizare, 5-6 subculturi pentru cultura permanentă; durata acestor subculturi pe medii de multiplicare este mai scurtă decât la inducție (7-10 zile).

Inducția embriogenă a fost consemnată dinamic atât în etapa observării primilor embrioni cât și în etapa confirmării (începutul formării țesutului embriogen, prin proliferarea embrionilor inițiali) (Fig. 1).

Următoarea etapă a constat în purificarea țesutului embriogen (purificare mecanică) când se separă țesutul embriogen (ESM) de cel neembriogen (CNE) urmată de stabilizarea culturii de ESM care începe odată cu confirmarea inducției embriogene. Această fază a durat până când toată cultura a proliferat activ și uniform (Fig 2-3).

Experiențele au fost efectuate în trei repetiții, rezultatele fiind date sub forma mediei aritmetice a celor trei repetiții. Datele au fost prelucrate cu ajutorul computerului (program EXCEL). Preparatele microscopice au fost efectuate prin metoda squash, fiind colorate cu aceto- carmin.

### Rezultate și discuții

Randamentul inducției embriogene este diferit la cele 10 genotipuri feminine:

- 4 genotipuri slabe cu inducție sub 10% (4P-6, 4P-7, 4P-11, 4P-23);
- 2 genotipuri medii cu inducție între 10-20% (4P-12, 4P-25);
- 4 genotipuri bune cu inducție între 20-35% (4P-24, 4P-33, 4P-34, 4P-38).

Randamentul stabilizării diferă și el la cele 10 genotipuri materne :

- 5 genotipuri slabe sub 10% (4P-6, 4P-7, 4P-11, 4P-12, 4P-23);
- 3 genotipuri medii între 10-20% (4P-25, 4P-33, 4P-34);
- 2 genotipuri bune peste 20% (4P-24, 4P-38).

Se observă diferențe între randamentul inducției și randamentul stabilizării. De exemplu, genotipurile 4P-33 și 4P-34, cu un randament al inducției bun – peste 20%, au un randament al stabilizării mediu sub 20%; în cazul genotipului 4P-38 deși randamentul inducției nu este cel mai mare – sub 30%, randamentul stabilizării este maxim – 23%. Rezultă astfel un număr mai mare de linii embriogene selecționate (Grafic 1).

În ceea ce privește randamentul inducției embriogene la hibridii reciproci rezultați din polenizări controlate (genotip matern) se constată:

Setul nr. 1

Părinți: A - capacitate embriogenă bună (inducție 22,5%, stabilizare 16,17%)

B - capacitate embriogenă slabă (inducție 2,94%, stabilizare 0,98%)

Hibridi: A♀ X B – capacitate embriogenă medie → bună (inducție 16,67%, stabilizare 11,76%)

B♀ X A - capacitate embriogenă slabă (inducție 4,17%, stabilizare 0)

Stabilizarea 0 apare deoarece materialul a fost insuficient (semințe seci); astfel au fost inoculați numai 31 de embrioni în trei repetiții, aproximativ 1/3 din cantitatea utilizată în celelalte combinații.

Rezultatul sugerează influența pozitivă a genotipului matern, dar materialul insuficient de explante la hibridul B♀ X A nu ne permite să avansăm o concluzie pertinentă (Grafic 2).

În cazul hibridilor reciproci rezultați din polenizări controlate (genotip feminin) se observă:

## Setul nr.2

Părinți: A' - capacitate embriogenă medie→bună (inducție 17,43%, stabilizare 10,83%)  
 B' - capacitate embriogenă medie (inducție 12,54%, stabilizare 5,79%);

Hibridi: A'♀ X B' și B'♀ X A' au capacitate embriogenă foarte apropiată de nivel mediu→slab (Grafic 3).

**Concluzii**

Toate cele 10 genotipuri maternelor în polenizare liberă au prezentat capacitate embriogenă.

Randamentul stabilizării (formării ESM) este sub randamentul inducției deoarece se înregistrează pierderi prin neproliferări suspensorale sau necroze la toate genotipurile.

La genotipurile cu randamente bune ale inducției și stabilizării consecința este numărul mare de linii embriogene selecționate.

Capacitatea embriogenă a hibridilor se află sub nivelul capacității embriogene a genitorilor.

În cazul polenizărilor controlate se observă că influența genotipului matern nu este evidentă.

Genotipul matern este mai puțin important decât s-a presupus inițial în cazul populațiilor prelucrate. Rezultă că materialul poate fi multiplicat prin embriogeneză somatică, cu o metodă optimizată și un număr de explante adecvat fiecărui genotip matern.

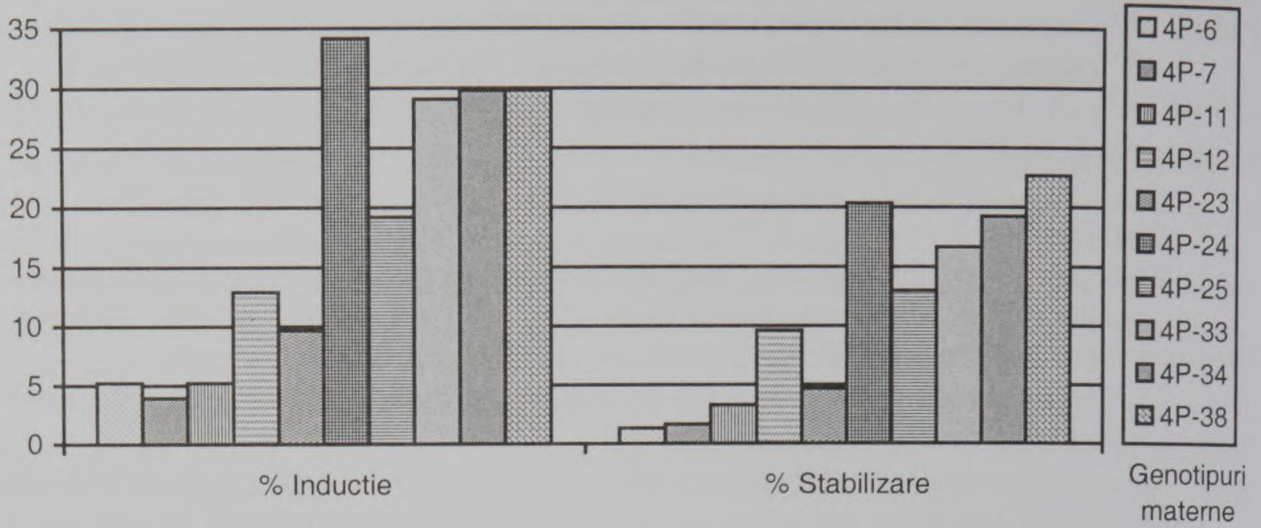
**Bibliografie**

1. GUPTA P. K., DURZAN D. J. & FUNKLER B. J. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen.
2. HAKMAN I., FOWKE L. C., von ARNOLD S. & ERIKSSON T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce).
3. LELU M. A., KLIMASZEWSKA K. K., JONES C., WARD C., von ADIRKAS P. & CHAREST P. J. 1993. A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch, *Forestry Canada*.
4. PALADA NICOLAU M., BERTCETCHE J. & PAQUES M. 1995. The physiological status of explant, a determinant factor for embryogenic tissue induction in *Picea abies*. In: Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees, Proc. Of IUFRO Joint Meeting, Gent, Belgium, 26-30 September 1995.
5. TANTORUS T. E., FOWKE L. C. & DUNSTAN D. I. 1991. Somatic embryogenesis in conifers, *Can. J. Bot.* **69**: 1873-1899.

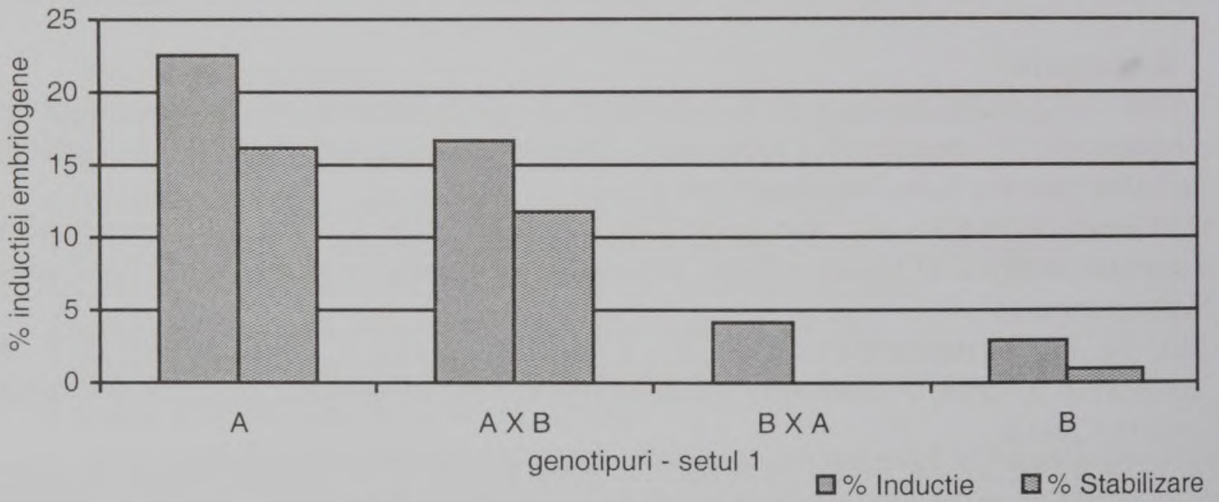
## THE ROLE OF THE MATERNAL GENOTYPE IN THE DETERMINATION OF EMBRYOGENIC CAPACITY IN SPRUCE

**Abstract:** The research-work done with respect to the role of the maternal genotype in the determination of embryogenic capacity in spruce, has shown that this role is less important than was previously supposed in the case of the material studied. Hence it results that the material can be multiplied by somatic embryogenesis, applying a suitable optimized method and several explants, adapted to the respective maternal genotype.

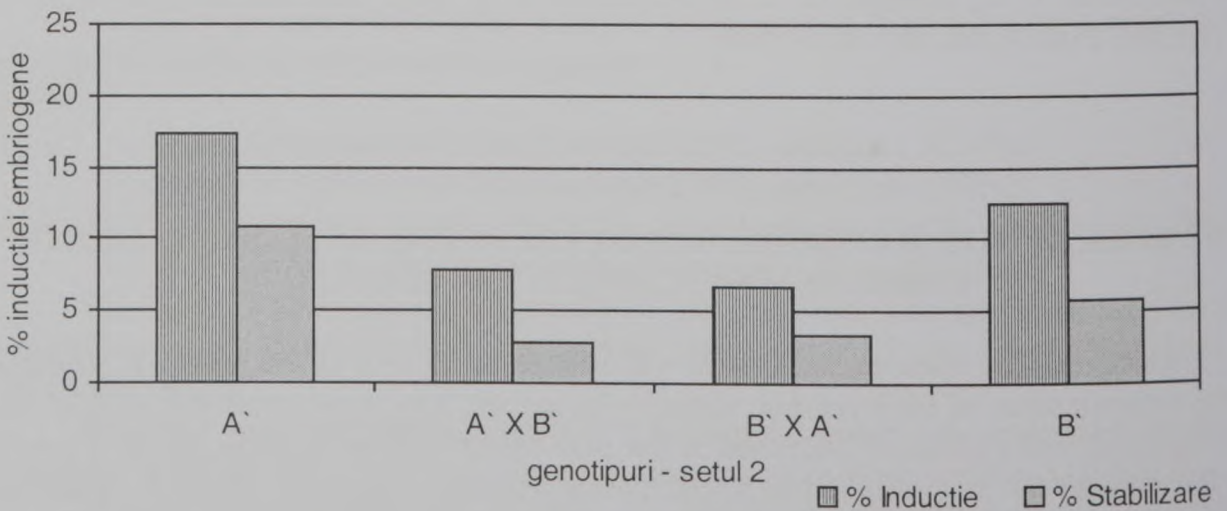
**Keywords:** *Picea abies* (L.) Karsten, maternal genotype, embryogenic capacity, embryogenic induction, confirmation, stabilization, selection of embryogenic lines.



Grafic 1. Randamentul inducției embriogene la 10 arbori de molid în polenizare liberă (genotipuri materne)



Grafic 2. Randamentul inducției embriogene la genitori și hibrizi reciproci (setul 1)



Grafic 3. Randamentul inducției embriogene la genitori și hibrizi reciproci (setul 2)