

STUDIUL UNOR LINII POLIPLOIDE DE TRIFOI ROȘU*(TRIFOLIUM PRATENSE L.)*

Dr. I. ANGHEL

Între plantele furajere, trifoiul roșu ocupă locul pe care-l deține grâul între cereale. În ultimii ani, ameliorarea trifoiului se face în special prin poliploidizare. Trifoiul fiind o specie care se cultivă pentru părțile vegetative (frunze, tulpini) și cu un număr relativ redus de cromozomi ($2n = 14$) se pretează mai bine la poliploidizare. Cercetări în acest domeniu datează din anul 1940 și aparțin lui *A. Levan* (Suedia) care a elaborat primele metode pentru inducerea experimentală a poliploidiei, cu ajutorul colchinei. Ulterior astfel de cercetări au fost inițiate în numeroase țări: Danemarca, Finlanda, Polonia, Germania, Ungaria, Italia, U.R.S.S., India. Printre cei care s-au ocupat cu această problemă amintim: *J. L. Brewbacker* (1952), *A. Evans* (1955), *C. J. Speckmann* (1958), *L. B. Bonyai* (1962), *S. Ellerström* (1951), *L. Halewiczowa* (1961), *H. O. Mackiewicz* (1961).

Ca urmare a rezultatelor pozitive pe care le-a dat poliploidia la trifoi, în momentul de față în diferite țări au fost experimentate și introduse în cultură numeroase forme poliploide: *Bernburg*, *Gross Lüsewitz* (Germania), *Ulva*, *Rea* (Suedia), *Molstad* (Norvegia), *Iotra I.* (Finlanda), *Wielkolistna* și *Gloria* (Polonia), *Tapior Poly* (Ungaria) etc. În țara noastră cercetări în acest domeniu au inițiat *C. Pamfil* și *I. Anghel* (1965).

Material și metode

Cercetările noastre au început în 1965 prin tratarea cu colchicină, în soluții apoase de 0,2% a unor plante din soiurile diploide Essi, V-508 și Transilvania 50/9*.

* Semințele au fost obținute prin amabilitatea Institutului de cercetări pentru cultura sfecei și cartofului Brașov.

Semințele se pun la germinat pe hîrtie de filtru. Imediat după germinare, plantele sînt imersionate cu vîrfurile de creștere în soluție de colchicină, timp de 1, 2, 3, ore. Se recomandă să se evite scufundarea rădăcinilor în colchicină, care fiind mai sensibile se necrozează. Pentru a evita uscarea rădăcinilor se acoperă cu o hîrtie de filtru sau vată, îmbibată cu apă. Se spală cu apă de robinet și se însămîntează în lădițe cu pămînt. După prinderea plantelor, se continuă tratamentul, prin depunerea pe vîrfurile de creștere a unei picături de colchicină în concentrație de 0,2% timp de 3 zile, sau în concentrație de 0,1% timp de 6 zile, de trei ori pe zi.

Depistarea plantelor autotetraploide s-a făcut prin metode indirecte macroscopice (studiul comparativ al plantelor tratate și netratate) și microscopice (densitatea stomatelor în cîmpul microscopic, lungimea stomatelor în μ , numărul de cloroplaste în stomate; mărimea polenului și numărul de pori germinativi), precum și prin determinarea directă a numărului de cromozomi în țesutul meristematic al rădăcinilor embrionare, prin metoda Feulgen.

A fost efectuat de asemenea un studiu comparativ al unor linii autotetraploide, din colecția catedrei: Gross Lüsewitz, Bernburg, Tripo, Rea, Ulva, Wielkolistna.

Rezultate și discuții

Tratamentul cu soluții apoase de colchicină a determinat modificări importante, la o parte din plante, cum sînt: îngroșarea tulpinii și a frunzelor, încetinirea ritmului de creștere a plantelor, iar un procent de 71% plante au pierit. Un număr de plante au devenit complet anormale, în sensul că frunzele și tulpinile s-au îngroșat exagerat, iar după un timp creșterea plantelor a încetat complet.

Pentru studiu au fost reținute numai plantele puternic modificate. Astfel din totalul de 430 plante tratate cu soluții de 0,2% colchicină, aparținînd la 3 soiuri, au fost identificate ca fiind complet tetraploide un număr de 9 plante (0,59%) din care 2 plante (0,13) la soiul Essi, 3 (0,19) la soiul V508 și 4 (0,26) la soiul Transilvania 50/9. Nu au fost identificate plante tetraploide în rîndul celor tratate cu soluție de 0,1%. Au fost identificate mai multe plante mixoploide, cu țesuturi formate din celule $2n$ și $4n$.

Studiul comparativ al plantelor diploide și tetraploide arată că din cauza dublării numărului de cromozomi, la plantele autotetraploide are loc o creștere a numărului de cloroplaste în stomate și a porilor germinativi; creșterea lungimii stomatelor, a diametrului polenului și o scădere a frecvenței stomatelor în cîmpul microscopic (Tabelul 1—4).

Astfel, datorită corelației care există între gradul de poliploidie și caracterele anatomomorfologice se constată o creștere a numărului de cloroplaste în stomate, proporțională cu gradul de ploidie. Acest lucru se constată la toate variantele studiate. În cifre relative depășirea variază între 176% (la soiul Rea Svalof) și 210% la Wielkolistna (Tabe-

lul 1). O creștere asemănătoare a numărului de cloroplaste se întâlnește și în celulele epidermei și ale țesutului palisadic.

Dimensiunea stomatelor în microni este considerabil mai mare la tetraploizi, comparativ cu formele diploide. În valori relative depășirea variază între 126,5—139,0 (Tabelul 2). Din cauză că celulele și respectiv stomatele plantelor poliploide au dimensiuni superioare diploizilor, *frecvența stomatelor 4n în câmpul microscopic* este mai mică decât la plantele 2n (Tabelul 3).

Dimensiunea polenului. Măsurătorile efectuate la grăunciori de polen, au arătat că la poliploizi, dimensiunile în microni sînt mai mari cu 126% la autotetraploizi față de diploizi. Din această cauză mărimea polenului constituie una din cele mai sigure căi de deosebire a plantelor poliploide de cele diploide sau mixoploide. În afară de schimbarea mărimii grăunciorilor de polen se modifică forma lor și crește procentul de grăunciori de polen sterili. Astfel la plantele diploide polenul este mai mic și relativ uniform, în timp ce la plantele autotetraploide grăunciorii de polen sînt neuniformi, iar diametrul crește proporțional cu gradul de ploidie (Tabelul 4).

Numărul de pori germinativi. Cercetările efectuate de Funke (1956) la o serie de plante poliploide, naturale sau artificiale, atestă existența unei corelații între numărul de pori germinativi ai grăunciorilor de polen și gradul de poliploidie. Din tabelul nr. 5 se constată că la plantele diploide numărul de pori germinativi variază între 1—3, în timp ce la poliploizii corespunzători acest număr ajunge pînă la 6, procentul celor cu 3, 4, 5 pori, fiind mai mare decât la diploizi.

*
* *

Din tabelele nr. 1—6 se poate constata că diferențele între mediile de la plantele diploide și poliploide sînt în toate cazurile foarte semnificative ($t > 3,29$). De asemenea se poate observă că aceste caractere sînt relativ constante pentru fiecare variantă și variază în limite foarte restrînse de la un an la altul.

Caractere morfologice macroscopice

Schimbarea raportului nucleo-plasmatic determină modificări importante a întregii plante, în sensul că frunzele sînt mai mari, mai groase și au o culoare verde închis, datorită conținutului mai ridicat de clorofilă. În același sens se modifică lungimea și grosimea pețiolului și a tulpinii etc. (Tabelul 7).

Studiul comparativ al plantelor colchicinizate cît și a celor poliploide arată o întîrziere în creștere, iar numărul total de frunze pe o plantă s-a redus. Aceasta se datorește probabil ritmului de diviziune mai lent la celulele tetraploide.

Cercetări asupra unor procese fiziologice

Procesele fiziologice ale plantelor poliploide sînt puțin studiate, în literatură există un număr relativ mic de lucrări, iar rezultatele sînt contradictorii. Cercetările efectuate asupra mai multor forme diploide și tetraploide de *Trifolium pratense*: Bernburg, Lüsewitz, Molstad, Ulva, Rea, Essi și Wielkolistna, au arătat că toate procesele fiziologice studiate decurg cu o intensitate mai mare la formele tetraploide în comparație cu cele diploide (graficul 1 și 2).

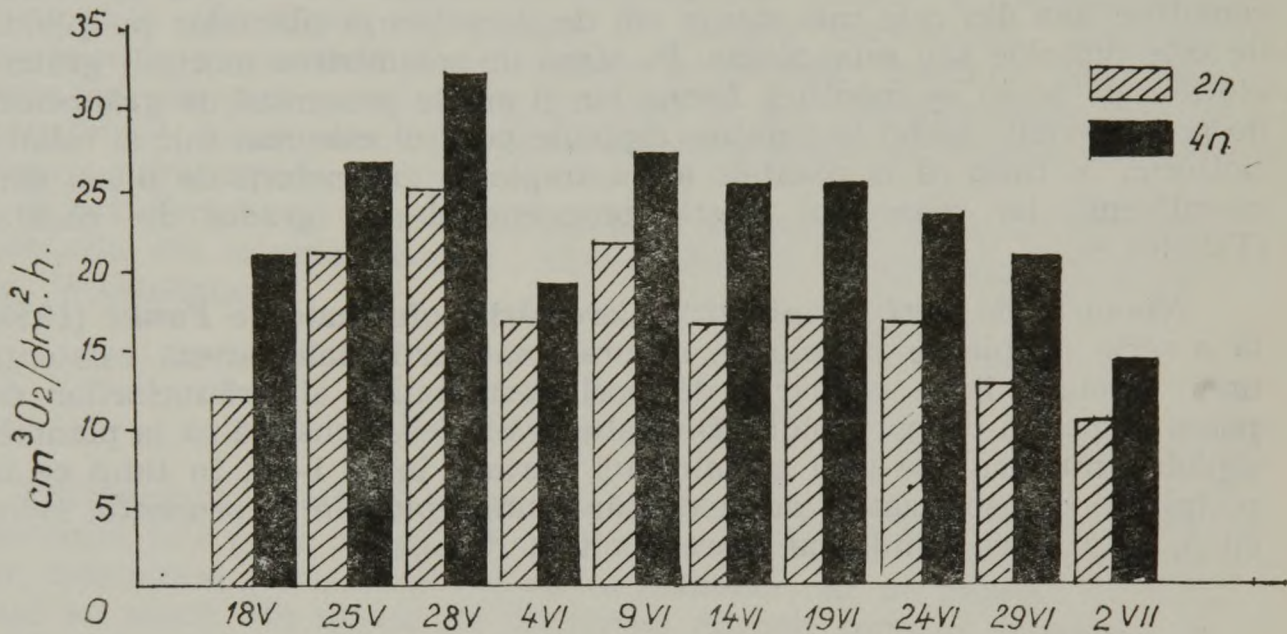


Fig. 1. Intensitatea fotosintezei la soiul Bernburg

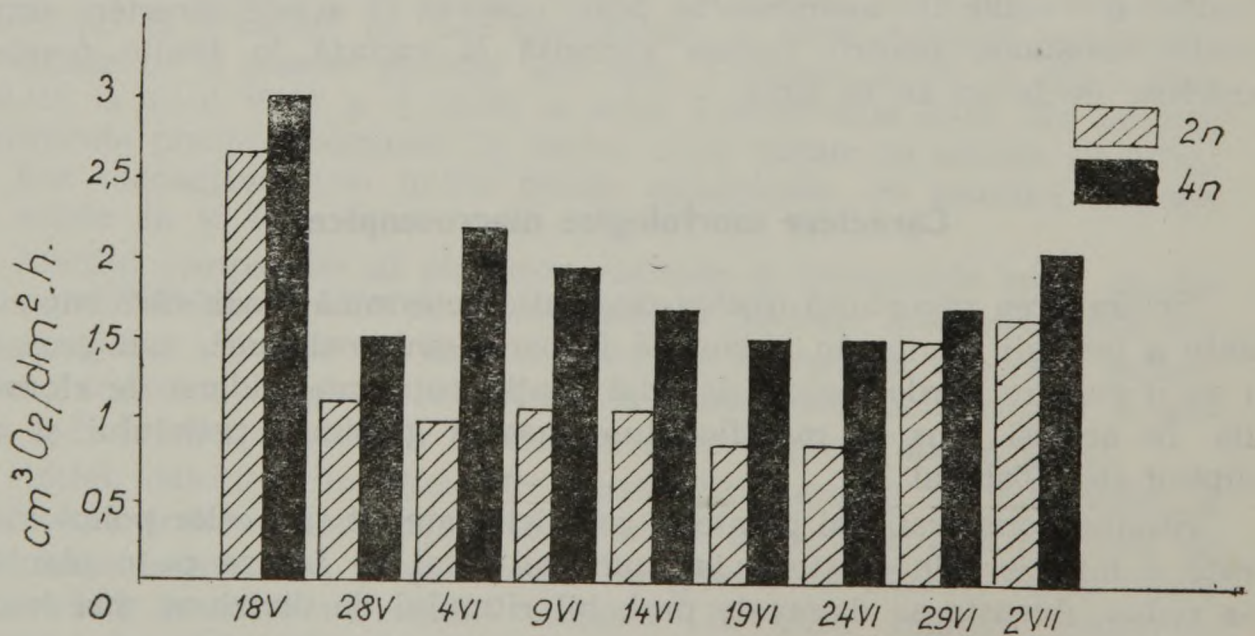


Fig. 2. Intensitatea respirației la soiul Bernburg.

Fertilitatea plantelor poliploide

Studiul comparativ al numărului de semințe efectuat, în perioada 1965—1968 la formele $2n$ și la cele $4n$ corespunzătoare, a arătat foarte concludent că autotetraploizii prezintă fertilitatea mult mai redusă decât a diploizilor, mai ales în primii ani după colchicinizare. Astfel numărul de semințe într-o inflorescență este de 46,9 la soiul diploid Bernburg și de numai 9,9 la tetraploidul corespunzător. Slaba fertilitate se datorește unor cauze multiple printre care amintim: numărul mai mic de inflorescențe pe unitate de suprafață, polenizarea săracă, datorită structurii florii, care prezintă tuburile corolei lungi, în timp ce insectele polenizatoare au trompă scurtă, tulburărilor citologice și fiziologice.

Concluzii

Prin tratarea repetată a plantelor diploide cu soluția apoasă de colchicină 0,2% s-au obținut plante tetraploide.

— Liniile tetraploide obținute de noi cât și cele studiate, prezintă caractere citologice, anatomo-morfologice, fiziologice și biochimice care le deosebesc evident de materialul inițial diploid.

— Liniile poliploide de trifoi roșu prezintă interes pentru folosirea în ameliorarea trifoiului roșu pe calea poliploidizării.

BIBLIOGRAFIE

- ARMSTRONG J. M., ROBERTSON R. W., 1956, *Studies and diploid and tetraploid alsike clover Trifolium hybridum*. Canad J. Agric. Sci. 36.
- BINGEFORS J., ELLERSTRÖM S., 1964, *Polyploides breeding in red clover. Tetraploid variety Svalöfs Ulva compared with some diploid and tetraploid varieties*. Z. für Pflanzenzüchtung, 51.4 : 315—334.
- BREWBAKER J. L., 1952, *Colchicine induction of tetraploides in Trifolium sp.* Agron. Journ. 4.
- EVANS M. A., 1955, *The production and identification of polyploids in Red Clover. White Clover and Lucerne*. New Phytologist, 54 : 149—162.
- HULEWICZ LACZYVİSKA T. L. und MACKIEWICZ T., 1963, „Der Züchter“ 33, Heft 1, 11—17.
- MACKIEWICZ H. O., 1963, *Studies on di-and tetraploid alsike clover (T. hybridum)*. Genetica Polonica, vol. 4, no. 2, 121—138.
- NOVALIHINA N. K., 1965, *Exsperimentalnoe polucenic tetraploidov u krasnovo clevera*. Poliploidia i selectia, 227—232.
- PAMFIL C., SEBÖK CLARA, RODICA SOPA, 1969, *Inducerea și identificarea autotetraploizilor de trifoi roșu de Transilvania*. Cercetări de Genetică, 124—131.
- VOICA C., L. ANGHEL, 1971, *Study of some physiological processes on the $2n$ and $4n$ forms of Trifolium pratense*. Acta Botanica, 35—92.

NUMĂRUL DE CLOROPLASTE ÎN STOMATE

Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs.	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Valoarea relativă %	Diferența	Semnificația diferenței 1
Bernburg	2n	200	6,41 ± 0,07	100	—	—
	4n	200	12,35 ± 0,11	192	+ 5,94	** *
Lüsewitz	2n	200	6,72 ± 0,09	100	—	—
	4n	200	12,23 ± 0,11	180	+ 5,51	** *
Essi	2n	200	5,86 ± 0,1	100	—	—
	4n	200	12,6 ± 0,12	205,0	+ 5,20	** *
V 508	2n	200	6,20 ± 0,08	100	—	—
	4n	200	11,96 ± 0,13	192,1	+ 5,76	** *
Transilvania 50/9	2n	200	6,22 ± 0,10	100	—	—
	4n	200	12,20 ± 0,12	196,0	+ 6,40	** *
Molstadt	2n	200	5,80 ± 0,1	100	—	—
Tripo	4n	200	11,96 ± 0,11	204	+ 6,16	** *
Rea Svalöf	4n	200	10,34 ± 0,13	176	+ 4,54	** *
Ulva Svalöf	4n	200	10,58 ± 0,18	182	+ 4,78	** *
Wielkolistna	4n	200	12,82 ± 0,16	210	+ 7,02	** *

1 Semnificația diferenței la soiurile Tripo, Rea, Ulva, Wielkolistna a fost calculată față de plantele diploide ce aparțin soiului Molstad.

Pentru a aprecia mai ușor gradul semnificației abaterii în lucrare se folosesc următoarele simboluri.

* = abatere pozitivă semnificativă 5% $\geq \alpha > 1\%$

** = abatere pozitivă distinct semnificativă 1% $\geq \alpha > 0,1\%$.

*** = abatere pozitivă foarte semnificativă $\alpha < 0,1\%$.

DIMENSIUNEA STOMATELOR ÎN μ

Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs.	$\bar{X} \pm sx$	Valoarea relativă %	Diferența	Semnificația diferenței
Bernburg	2n	200	21,38 ± 0,05	100	—	—
	4n	200	27,81 ± 0,06	+ 129,0	+ 6,43	***
Lüsewitz	2n	200	20,88 ± 0,06	100	—	—
	4n	200	26,46 ± 0,06	+ 132,0	+ 5,51	***
Essi	2n	200	20,30 ± 0,05	100	—	—
	4n	200	25,96 ± 0,06	+ 127,9	+ 5,66	***
V 508	2n	200	20,80 ± 0,05	100	—	—
	4n	200	26,32 ± 0,05	+ 126,5	+ 5,52	***
Transilvania 50/9	2n	200	21,06 ± 0,06	100	—	—
	4n	200	27,04 ± 0,06	128,2	+ 5,98	***
Molstadt	2n	200	20,06 ± 0,05	100	—	—
	4n	200	26,30 ± 0,06	127,0	+ 5,4	***
Rea Svalöf	4n	200	27,66 ± 0,05	139,0	+ 7,7	***
	4n	200	27,00 ± 0,06	137,0	+ 7,4	***
Wielkolistna	4n	200	26,80 ± 0,06	136,0	+ 7,1	***

FRECVENȚA STOMATELOR ÎN CÎMPUL MICROSCOPULUI

Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de obs.	$\bar{X} \pm s_x$	Valoarea relativă %	Diferența	Semnificația diferenței
Bernburg	2n	200	15,50 ± 0,5	100,0	—	—
	4n	200	6,20 ± 0,2	40,0	— 9,30	0 0 0
Lüsewitz	2n	200	12,70 ± 0,2	100,0	—	—
	4n	200	6,46 ± 0,2	50,0	— 6,24	0 0 0
Essi	2n	200	12,62 ± 0,3	100,0	—	—
	4n	200	6,60 ± 0,4	52,2	— 6,02	0 0 0
V 508	2n	200	13,02 ± 0,3	100,0	—	—
	4n	200	6,80 ± 0,03	53,0	— 6,22	0 0 0
Transilvania 50/9	2n	200	12,80 ± 0,02	100	—	—
	4n	200	6,30 ± 0,1	49,0	— 6,50	0 0 0
Molstadt	2n	200	12,14 ± 0,17	100	—	—
Tripo	4n	200	7,64 ± 0,09	62,9	— 4,50	0 0 0
Rea Svalöf	4n	200	4,70 ± 0,16	38,7	— 7,44	0 0 0
Ulva Svalöf	4n	200	4,60 ± 0,2	37,9	— 7,54	0 0 0
Wielkolistna	4n	200	6,00 ± 0,3	49,4	— 6,14	0 0 0

o = abatere negativă semnificativă 5% $\geq \alpha > 1\%$.

oo = abatere negativă distinct semnificativă 1% $\geq \alpha > 0,1\%$.

ooo = abatere negativă foarte semnificativă $\alpha < 0,1\%$.

DIMENSIUNEA POLENULUI ÎN μ

Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. de de obs.	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	Valoarea relativă %	Diferența	Semnificația diferenței
Bernburg	2n	200	48,32 \pm 0,40	100	—	—
	4n	200	61,09 \pm 1,5	125	+12,8	** *
Lüsewitz	2n	200	51,43 \pm 0,1	100	—	—
	4n	200	63,15 \pm 1,2	123	+11,72	** *
Essi	2n	200	47,7 \pm 1,5	100	—	—
	4n	200	63,09 \pm 1,5	130	+15,4	** *
V 508	2n	200	50,48 \pm 1,3	100	—	—
	4n	200	62,13 \pm 0,6	123	+11,14	** *
Transilvania 50/9	2n	200	48,3 \pm 0,9	100	—	—
	4n	200	60,13 \pm 1,1	124,4	+11,8	** *
Molstadt	2n	200	49,34 \pm 1,1	100	—	—
Tripo	4n	200	61,9 \pm 1,3	125,4	+12,56	** *
Rea Svalöf	4n	200	59,86 \pm 0,8	121,3	+10,52	** *
Ulva Svalöf	4n	200	62,30 \pm 1,2	126,2	+12,96	** *
Wielkolistna	4n	200	61,9 \pm 1,0	125,4	+12,56	** *

FERTILITATEA POLENULUI ȘI NUMĂRUL DE PORI GERMINATIVI

Soiul	Gradul de poliploidie	Nr. obs.	Fertilit. polenului %	Numărul de pori germinativi %						
				1	2	3	4	5	6	
Bernburg	2n	1000	70,7	94,5	1,86	3,99	—	—	—	—
	4n	1000	55,68	—	3,41	3,41	87,33	—	—	5,85
Lüsewitz	2n	1000	76,64	95,18	1,75	3,07	—	—	—	—
	4n	1000	57,16	—	—	0,99	97,03	—	—	1,98
Essi	2n	1000	75,26	93,5	2,56	3,94	—	—	—	—
	4n	1000	94,30	—	1,25	3,1	92,89	—	—	2,76
V 508	2n	1000	76,00	96,3	1,98	1,78	—	—	—	—
	4n	1000	58,36	—	2,97	4,01	89,97	—	—	3,05
Transilvania 50/9	2n	1000	78,56	95,2	1,70	3,10	—	—	—	—
	4n	1000	52,30	—	1,05	3,21	92,75	—	—	2,99
Molstadt	2n	1000	76,20	94,87	2,66	2,47	—	—	—	—
Tripo	4n	1000	53,96	—	—	1,36	95,08	—	—	3,56
Rea Svalöf	4n	1000	53,70	—	1,0	2,96	91,96	—	—	4,08
Ulva Svalöf	4n	1000	50,50	—	1,36	2,80	92,18	—	—	3,66
Wielkolistna	4n	1000	52,80	—	—	3,09	94,11	—	—	2,80

MĂSURĂTORI BIOMETRICE LA PLANTELE DIPLOIDE ȘI TETRAPLOIDE

Caracterul	Gradul de ploidie		Valoarea relativă % 2n = 100	Diferența	Semnificația diferenței
	2n	4n			
Greutatea plantelor (g)	178	210,8	118	+ 32,2	* * *
Greutatea tulpinilor (g)	74,6	78,8	105	+ 4,2	—
Înălțimea plantei (cm)	46,9	52,8	113	+ 6,2	* * *
Numărul mediu de tulpini	5,3	4,2	80	— 0,9	—
Grosimea tulpinii la internod (mm)	3,9	4,8	123	+ 0,9	* * *
Grosimea tulpinii la nod (mm)	5,1	6,8	133	+ 1,7	* * *
Lungimea tulpinii principale (cm)	33,6	43,1	128	+ 9,5	* * *
Numărul mediu de frunze	320	217	68	— 103	0 0 0
Greutatea frunzelor (g)	52,3	66,5	127	+ 14,2	* * *
Lungimea foliolei (cm)	3,6	4,52	126	+ 0,92	* * *
Lățimea foliolei (cm)	2,1	3,75	179	+ 1,65	* * *
Suprafața foliolei (cm ²)	12,8	17,3	137	+ 4,5	* * *
Lungimea petiolului (cm)	10,2	15,1	148	+ 4,9	* * *
Grosimea petiolului (mm)	1,5	1,7	113	+ 0,2	* * *
Numărul de flori în inflorescențe	79,2	91,2	115	+ 12,0	* * *
Greutatea inflorescenței (g)	42,8	59,9	140	+ 17,1	* * *
Lungimea tubului floral	8,99	9,27	103	+ 0,28	* * *

A STUDY OF SOME VARIETIES OF RED CLOVER POLYPLOIDS (TRIFOLIUM PRATENSE L.)

Summary

Autotetraploid plants obtained during the 1965—1968 period and some varieties autopolyploids from our collection, were analyzed in C1—C3 in comparison with original diploid materials, with respect to some anatomo-morphological, and physiological features.

Doubling of the chromosome number determines an increase of the nucleus volume and, consequently, of the whole cell, a change in the nucleus cytoplasm ratio takes place, appearing in characteristic gigantism phenomena. This change results in important modifications of the whole plant. The duplication of the chromosome number results in a higher number of chloroplasts in the stomata, an increasing stomata length and pollen diameter, a diminution of the stomata frequency in the microscopic field (table 2—6) and a chlorophyll amount growing: This change results in important modifications of the whole plant (table 1).

We have found that the intensity of photosynthesis, respiration and transpiration is higher for the tetraploid forms.

Our study shows that a complete agreement between the degree of polyploidy and some anatomical-morphological micro- and macroscopic features the tetraploid lines obtained by us show cytological, anatomo-morphological physiological features which differentiate them from the original diploid material.