

**UNIVERSITATEA DIN CRAIOVA
FACULTATEA DE HORTICULTURA**

Contract de cercetare NR.1063 IDEI COD 430 / 2009

Titlul:

**„CERCETARI PRIVIND FORMAREA FRUCTULUI
PRIN APOMIXIE LA SOIURI DE NUC AUTOHTONE„**

(Sinteza)

**Director proiect
Conf.univ.dr. Cosmulescu Sina Niculina**

FAZA 2009

"[Apomixis este] un instrument în curs de dezvoltare cu impact revoluționar pentru agricultura secolului 21."

"[Apomixis is] an emerging tool of revolutionary potential impact for the agriculture of the 21st century."

(Savidan, 2000)

REZULTATE OBTINUTE 2009

(Sinteza)

Obiectivele proiectului pentru anul 2009 au fost:

1. Aprofundarea cunostintelor fundamentale, proiectarea modelului experimental si elaborarea modelului de lucru.
2. Inventarierea bazelor de date din domeniu. Studii, analize, determinari privind apomixia la nuc.
3. Obținerea fructelor apomictice. Studii embriologice si citologice la fructele apomictice. Interpretarea rezultatelor si valorificarea.

Cuvântul „apomixie” provine din limba greacă și înseamnă "fără amestec" (apo = "departe" și mixis = "amestec"). Conceptul este folosit în sens îngust ca sinonim pentru agamospermie, care înseamnă formarea de semințe fără fertilizare. Termenul de apomixie este folosit ca fiind sinonim cu înmulțirea vegetativă. *Asker și Jerling (1992)* folosesc termenul de înmulțire asexuata prin semințe.

Apomixia oferă diferite beneficii de îmbunătățire a culturilor în agricultură. Aceasta permite reproducerea vegetativă, prin semințe și, astfel, poate avea un impact major nu numai la culturile ce se înmulțesc prin semințe, dar și în culturile ce se înmulțesc vegetativ. Apomixia are potențialul de a revoluționa producția vegetală prin maximizarea producției și prin fixarea vigoriei hibride.

Cercetări întreprinse la nuc, privind formarea fructului, au arătat că unele soiuri pot forma fructe și fără fecundare, pe cale partenocarpică sau apomictică. Posibilitățile formării fructelor fără polenizare la nuc, în condiții obișnuite, au prezentat un interes deosebit pentru cercetătorii biologiei înfloritului și formării semințelor. Formarea fructelor prin apomixie, prezintă importanță teoretică și practică, embrionul fiind homozigot transmite fidel caracterele plantei mamă.

Materialul biologic

Pentru realizarea obiectivelor proiectului, experiențele au fost amplasate la SCDP Vâlcea. În studiu au fost folosite soiuri de nuc, altoite pe portaltoi de *Juglans regia* ('Germisara', 'Jupânești', 'Franquette', 'Vina', 'Valcor') și hibrizi apomictici proveniți din cercetări anterioare. Au fost folosite soiuri și hibrizi incluzând toate tipurile de dichogamie: protandrie, protoginie, homogamie.

Materialul biologic folosit în experiență poate fi împărțit astfel:

1. Soiuri aflate în cultură, altoite pe selecții portaltoi *Juglans regia*, la care se determină posibilitatea de formare a fructelor apomictice (foto1).

2. Hibridi considerați apomictici, la care se va urmări posibilitatea de formare a fructelor apomictice și studiul descendenței (chemotaxonomia).

3. Material biologic (altoit) în pepinieră – se va urmări modul de formare a fructelor în pepinieră (precocitate de rodire, înflorire târzie, lipsă polen) și studiul descendenței (foto 2-5).



Foto 2-5: Imagini din pepinieră (precocitate de rodire, înflorire târzie)

Metode de cercetare

Din literatura de specialitate, reiese faptul că apomixia este influențată și de perioada de înflorire, dar și de factorii de mediu. Pentru a determina particularitățile fenologice ale mugurilor micști femeiești și mugurilor amenți, au fost efectuate observații fenologice în câmp, stabilindu-se datele calendaristice la care s-au înregistrat stadiile reper, folosind ca element de comparație stadiile reper elaborate de Bergaunoux și GrosPierre (1975).

Pentru secțiuni prin fructul apomictic și fructul normal dezvoltat, au fost recoltate fructele, fixate în fixatorul FAA (80% etanol : 10% acid acetic glacial : 10% formol) și ținute la frigider. Secțiunile transversale și longitudinale au fost vizualizate la microscop și fotografiate.

S-a elaborat protocolul de lucru pentru polifenoli în scopul folosirii markerilor chimici în identificarea fructelor apomictice (chemotaxonomie). Pentru identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi s-a adoptat tehnica cromatografiei lichide de înaltă performanță în fază inversă, HPLC-RP. În acest sens a fost utilizat un sistem HPLC-SURVEYOR Plus, produs de firma Thermo Electron, configurat cu pompa cuaternară și degazor de vid incorporat **SRVYR-LPMPP**, autosampler termostatat Peltier **SRVYR-ASP**, detector UV-VIS cu sir de diode și celulă în flux de 5 cm, **SRVYR-PDA5P**, coloană Chromsep HPLC (250x4.6 mm, Hypersil 5 BDS) și software CHROMQUEST pentru controlul instrumentului, diagnostic, achiziția și procesarea datelor.

Rezultate obținute.

Perioada de înflorire, dichogamia, calitatea polenului

Literatura de specialitate arată că la soiurile protandre apomixia este mai frecventă decât la cele protogine. Perioada de înflorire a fost studiată și analizată pe 3 ani calendaristici. Referitor la perioada de înflorire, se constată că înflorirea nucului, în zona subcarpatică a Olteniei, are loc în a doua jumătate a lunii aprilie – prima jumătate a lunii mai, strâns legată de oscilațiile factorilor climatici din perioada deschiderii florilor bărbătești și femeiești. În funcție de perioada de înflorire, soiurile studiate au fost

grupate în 4 clase de înflorire și anume: timpuriu (20-30 aprilie), semitimpuriu (1-5 mai), semitârziu (6-10 mai), târziu (după 10 mai). Perioada și durata de înflorire se schimbă de la un an la altul la același soi, în strânsă corelație cu factorii de mediu. S-a constatat că manifestarea fenomenului de dichogamie este influențată într-un anumit grad și de alți factori, cum ar fi: umiditatea relativă a aerului, intensitatea și durata luminozității, vântul, etc. În perioada studiată, temperatura medie a variat între 11,2 - 16,3 °C în perioada de înflorire a florilor femeiești și între 10,2-17,8 °C în perioada de înflorire a amentilor. Cea mai mare parte a soiurilor și-au desfășurat perioada de înflorire la temperaturi de peste 13,7°C. Se constată că pentru zona studiată, soiurile de nuc își desfășoară perioada de înflorire la temperaturi cuprinse între 11,2-16,3 °C. Calculând distribuția procentuală a soiurilor în funcție de temperatura medie și durata de înflorire a amentilor, se constată că acestea se repartizează în 5 clase de frecvență și că înflorirea amentilor are loc cu preponderență la temperaturi cuprinse în intervalul 14-15,9 °C (44,45%). Tipul de înflorire se menține an de an, într-un anumit grad, strâns legat de condițiile climatice din perioada respectivă. În condițiile unor oscilații mari ale temperaturii și umidității relative a aerului, gradul de dichogamie este mai mult sau mai puțin constant, sau variază destul de mult.

Calitatea polenului, la nuc, este un element important de care depinde fecundarea. La soiurile analizate au fost efectuate determinări privind mărimea grăunciorilor de polen, viabilitatea și germinarea „in vitro”. Diametrul minim al grăunciorilor de polen la cele 6 soiuri, a avut o valoare medie în anii de cercetare de 37,5μ, cu limite între 37,7 μ și 39,0 μ. Diametrul mediu a fost de 41,6 μ cu limite între 40,2 μ și 34,1 μ. Diametrul maxim a fost în medie de 44,7 μ , cu limite între 42,7 μ și 48,7 μ (foto 6,7,8).

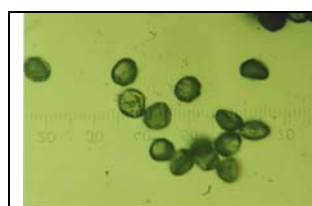


Foto 6: Mărimea grăunciorilor de polen soiul Roxana (40x)

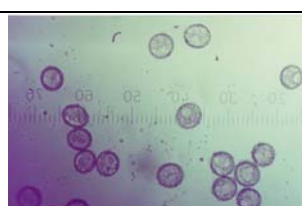


Foto 7: Mărimea grăunciorilor de polen soiul Jupânești (40x)

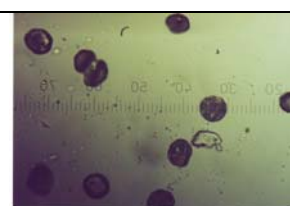


Foto 8: Mărimea grăunciorilor de polen soiul Mihaela (40x)

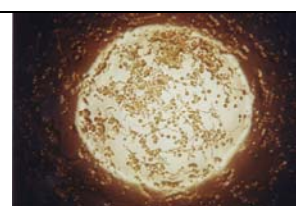


Foto 9: Polen germinat, soiul Jupânești (20x)

Procentul de germinare mediu, a înregistrat valori de peste 60% (foto 9).

Obținerea fructelor apomictice. Studii embriologice și citologice la fructele apomictice.

După înnegrirea stigmatei și desfacerea pungilor a fost calculat procentul de fructe apomictice. Valorile obținute au fost mici, sub 5% la toate soiurile, ceea ce confirmă faptul că la nuc nu se pot aștepta producții economice prin apomixie. Fotografiiile (10-19) au fost realizate în perioada de început a creșterii fructului și pun în evidență fructele apomictice aflate în diferite stadii de dezvoltare la soiurile și hibridii luați în studiu.



Cercetările au fost extinse și asupra materialului biologic altoit din pepinieră. De remarcant este faptul, că în pepinieră, soiuri altoite pe selecții portaltai din *Juglans regia* (VL203 PO), leagă fructe fără polenizare, deoarece înflorirea și fecundarea au loc într-o perioadă când sursa de polen lipsește (foto 20-22). Formarea fructelor partenocarpice la soiuri cu înflorire târzie este susținută și de literatura de specialitate, care susține că soiurile cu înflorire târzie formează mult mai des fructe partenocarpice decât cele cu înflorire timpurie. Se va urmări să se identifice și să se stabilească modul de formare a fructelor obținute în pepinieră, corelația dintre procentul de fructe obținute și tipul de înflorire.



Foto 20-22: Imagini din pepinieră (soiul 'Valrex' altoit pe selecția portaltai VL203 PO)

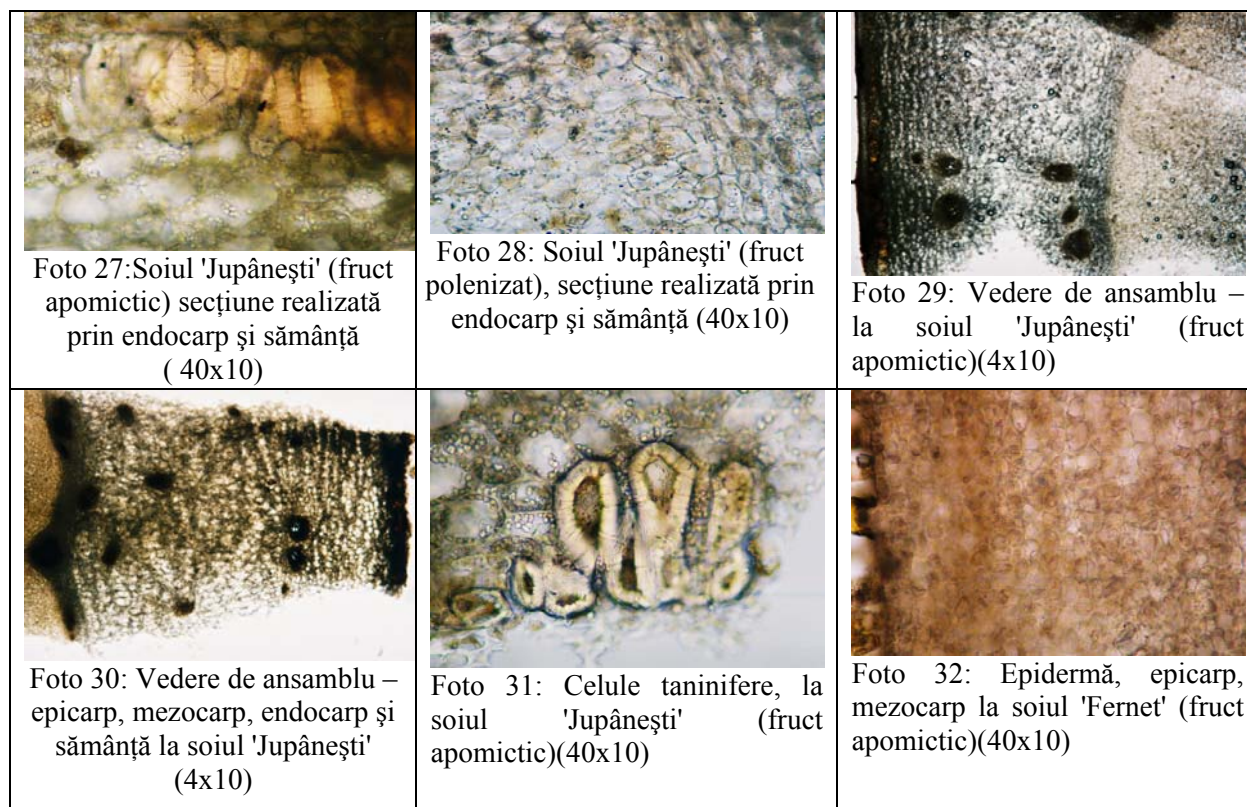
Pentru determinarea modului de formare a fructului apomictic și a diferențelor morfologice fruct normal/fruct apomictic, au fost realizate secțiuni prin fruct, fructe aflate în perioada de creștere (Foto

23-26). De obicei, dimensiunile fructelor apomictice sunt mai mici decât cele obținute prin polenizare liberă.



Foto 23-26: Fructe obținute prin polenizare liberă și fructe apomictice

Au fost realizate secțiuni prin fructe apomictice și fructe obținute în urma polenizării, (figura 27-32). La fructul apomictic (foto 27), soiul 'Jupânești', epiderma este unistratificată și prevăzută cu cuticulă groasă. Celulele taninifere pătrund în mezocarp (foto 27, 31). Epicarpul este format din 2-3 straturi de celule cu pereții ușor colenchimatizați (foto 29), iar sub el se găsesc numeroase celule taninifere, unele fiind mari, alungite în sens radial și pătrund în mezocarp. Mezocarpul este alcătuit din celule sferoidale și ovoidale cu mici spații între ele și cu numeroase cloroplaste în interior. În mezocarp se găsesc fascicule conducătoare libero-lemnoase mai mici decât la forma polenizată (foto 30) și dispuse oarecum ordonat pe două cercuri, unul dispus sub epicarp și celălalt la exteriorul endocarpului, iar în alte zone sunt dispuse neordonat.



La soiul 'Fernet', secțiune prin epidermă, epicarp și o parte din mezocarp prin fructul apomictic (foto 32), pune în evidență o epidermă unistratificată, prevăzută cu o cuticulă foarte subțire și

numeroși peri pluricelulari alunghiți, măciucați. Fructul se afla în perioada imediat după fecundare (stigmatе înnegrite). În această etapă de dezvoltare, epicarpul este puțin diferențiat, alcătuit din 4-5 straturi de celule cu pereți subțiri și ușor alungite în sens tangetial. Mezocarpul format din celule sferoidale și ovoidale fără cloroplaste în interior. Fasciculele conducătoare sunt în curs de diferențiere și sunt dispuse neordonat. Endocarpul este nediferențiat și nu se poate face deosebirea între mezocarp, endocarp și sămânță. În unele zone se observă epiderma internă a ovarului.

Studiul descendenței prin markeri chimici (chemotaxonomie). Stabilirea protocolului de lucru.

Din punct de vedere taxonomic, fenolii s-au dovedit a fi cei mai popular tip de metabolit secundar (Smith, 1976), iar numărul de studii chemosistematice pe baza acestor markeri au fost pe larg raportate. S-a realizat extractia, identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi din frunze și mezocarp de nuc de la șapte soiuri și hibrizi. Probele au fost recoltate în perioada 15.08-15.09 și au fost conservate prin congelare la temperatura de -40°C . Probele, formate din produsele vegetale fin mărunțite, în cantitate de 500 mg cântărite cu precizie de 0,0001, introduse în vase conice împreună cu 20 mL metanol cu 1% BHT(2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol), acoperite cu parafilm și folie de aluminiu, s-au menținut la temperatura de 25°C pe o baie cu ultrasunete timp de 40 minute. Extractele s-au separat prin centrifugare la 1200 g folosind o centrifugă HERMLE Z 233 MK-2. Supernatantele au fost filtrate prin membrane de poliamidă cu diametrul porilor de $0,22\ \mu\text{m}$ și stocate la temperatura de -20°C .

Pentru identificarea și cuantificarea polifenolilor liberi s-a adoptat tehnica cromatografiei lichide de înaltă performanță în fază inversă, HPLC-RP. În acest sens a fost utilizat un sistem HPLC-SURVEYOR Plus, produs de firma Thermo Electron, configurat cu pompa cuaternara și degazor de vid incorporat **SRVYR-LPMPP**, autosampler termostatat Peltier **SRVYR-ASP**, detector UV-VIS cu sir de diode și celulă în flux de 5 cm, **SRVYR-PDA5P**, coloană Chromsep HPLC (250x4.6 mm, Hypersil 5 BDS) și software CHROMQUEST pentru controlul instrumentului, diagnostic, achiziția și procesarea datelor.

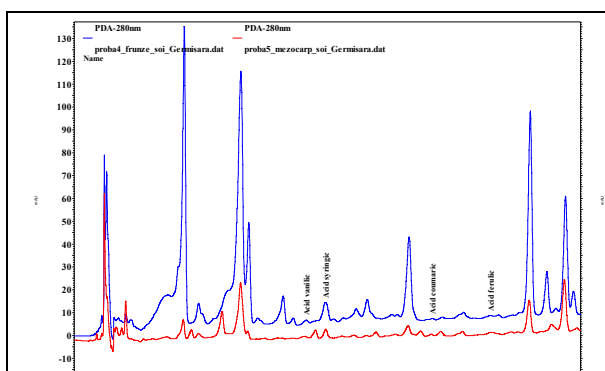


Figura 33: Cromatograma pentru acid vanilic, acid syringic, acid coumaric, acid ferulic (soiul Germisara)

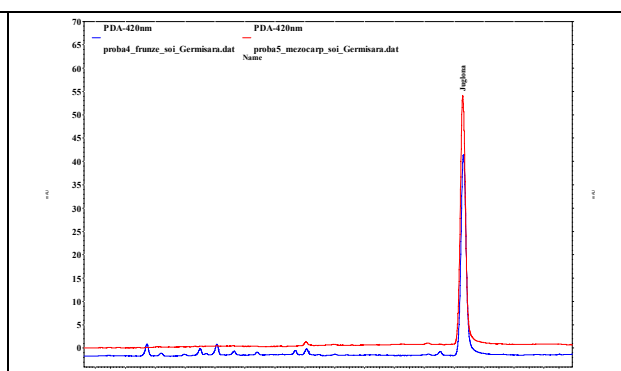


Figura 34: Cromatograma pentru juglona (soiul Germisara)

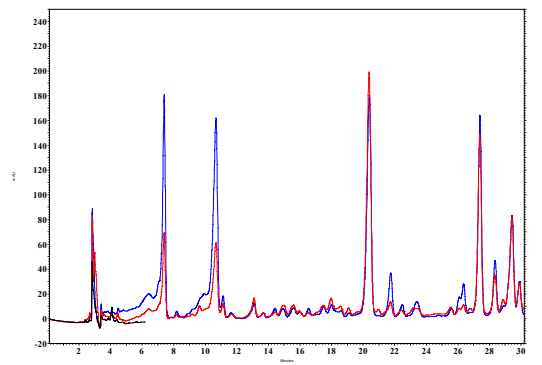
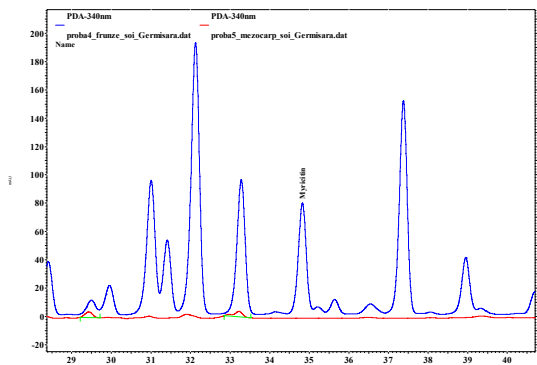


Figura 35: Cromatograma pentru myricetină (soiul Germisara)