

GENETICA, BIOLOGIA MOLECULARĂ ȘI AMELIORAREA

DUBLAREA NUMĂRULUI DE CROMOZOMI LA PLANTELE HAPLOIDE DE PORUMB

Rotarenco V.¹, Sarmaniuc M.¹, Popescu V.², Cliciuc D.¹ Mihailov M.,¹
Maslobrod S.,¹ Jacotă A.¹

¹ *Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al Academiei
de Științe a Moldovei,*

² *Universitatea Academiei de Științe a Moldovei*

Introducere

În ultimul deceniu, majoritatea celor mai mari companii de producere a porumbului, utilizează dublarea cromozomilor la plante haploide, ca tehnologie nouă de creare a liniilor homozigote și hibrizilor. După metoda tradițională, pentru obținerea liniilor homozigote sunt necesare 5-7 autopolenizări. Tehnologia liniilor dublate haploid permite obținerea liniilor pure timp de două sezoane, iar procesul se micșorează de 2-3 ori. Primul sezon prevede obținerea haploizilor din materialul inițial, al doilea sezon – dublarea genomului haploid.

În prezent, obținerea haploizilor în număr mare a devenit posibilă odată cu crearea inductorilor genetici efectivi: Stock 6 [7], MHI [5], etc.

Haploizii reprezintă plante cu garnitură redusă de cromozomi (n), comparativ cu forma inițială ($2n$), dezvoltându-se din ovule nefecundate, ca haploizi matroclini. De asemenea, din cauza dereglărilor ce au loc în meioză, la haploizi nu se formează celule generative. Astfel, pentru restaurarea setului diploid, prin diferite metode cromozomii se dublează.

Dublarea cromozomilor poate avea loc pe diferite căi: naturală și artificială. Spontan, frecvența dublării cromozomilor atinge valori de până la 3 % [6, 3, 8]. Astfel, pentru o utilizare eficientă a haploizilor în genetică și ameliorare, cea mai necesară este dublarea artificială.

S-a determinat, că dublarea artificială poate fi indusă de diferiți factori: chimici, fizici, etc. Dintre factorii fizici, cel mai frecvent se utilizează temperaturile scăzute și ridicate [4].

Din factorii chimici în prezent, la dublarea numărului de cromozomi, cel mai frecvent se utilizează colchicina ($C_{22}H_{24}O_6$). Acesta este un alcaloid, care se obține din semințe de *Colchicum autumnale* L. [20]. Mecanismul acțiunii, constă în evitarea divizării celulare în timpul mitozei. Ca rezultat, anafaza și telofaza nu are loc, iar după metafază în celulă rămâne numărul dublu de cromozomi [12].

Un criteriu important, în elaborarea metodelor de dublare a numărului de cromozomi, este concentrația reagentului. S-a determinat, că efectul acțiunii reagentului depinde de un sistem întreg de factori, dintre care temperatura, faza de dezvoltare, modul de tratare, vigurozitatea plantei [11].

Colchicina se utilizează la obținerea liniilor dublate haploid, atât *in vivo*, cât și *in vitro*. *In vitro*, utilizarea colchicinei prevede tratarea calusului obținut din cultura de stamine. Rezultatele obținute, indică o frecvență a dublării de până la 50% de plante tratate [1]. Din cauza sensibilității înalte a multor genotipuri de a se dezvolta *in vitro*, această metodă are o utilizare mult mai restrânsă. *In vivo*, colchicina induce dublarea cromozomilor prin tratarea materialului la diferite faze de dezvoltare prin diferite metode [8 – 11, 13 – 16, 21, 22].

În prezent una din cele mai cunoscute și utilizate metode de dublare a cromozomilor *in vivo* la plantele haploide este metoda Deimling [8]. Însă această metodă, la fel posedă un șir de dezavantaje: viabilitate joasă a plantelor tratate – în jur de 50 %, dintre acestea doar 40 % sunt fertile, dar cu cantitate limitată de polen, ceea ce împiedică semnificativ autopolenizarea și în final doar 10-15 % de plante (din cele inițiale) formează semințe. În medie, pe știulete se formează câte 5 boabe, ceea ce necesită un sezon adăugător pentru înmulțirea lor.

În afară de colchicină, la obținerea liniilor dublate haploid se mai folosesc și alți agenți chimici. Ca exemplu: *nitrous oxide* [18, 19] sau diferite erbicide cu acțiune asupra divizării celulare, ca *pronamidele*, *oryzalinul*, *trifluralinul* [2, 17].

În general se poate constata, că metodele de dublare a cromozomilor la plantele haploide, elaborate până în prezent, au o eficacitate scăzută, reprezintă un lucru minuțios și costisitor. De asemenea, ele permit dublarea parțială a plantei (mixoploizi), așa plante posedă celule, atât diploide, cât și haploide, ceea ce reprezintă cauza polenului limitat și a numărului redus de boabe.

În prezent sunt necesare metode ce ar permite o dublare completă a plantelor într-un număr mult mai mare, fără probleme ce țin de cantitatea mică a polenului pentru autopolenizare, și numărul redus de boabe. De altfel, noile metodele trebuie să fie simple la realizare și cu cheltuieli minime.

Astfel, scopul prezentei lucrări, constă în testarea metodei de dublare a plantelor haploide în condiții de câmp, prin diferite moduri.

Material și metode

A fost testată metoda de dublare a numărului de cromozomi în condiții de câmp. Ca material de cercetare în condiții de câmp au servit haploizii crescuți până la faza de 3 – 4 frunze a doi hibridi MK109 x Rf7 și Ku123 x Rf7. În calitate de material de cercetare în condiții de laborator au servit haploizii la faza de boabe uscate a populației sintetice SPC4.

În calitate de reactiv de dublare a servit colchicina cu concentrațiile de 0,06 %

și 0,12 %. Tratarea cu colchicină în condiții de câmp, s-a realizat la nivelul meristemei apicale, prin diferite procedee, iar în condiții de laborator – la nivel de coleoptil.

În condiții de câmp, au fost testate trei procedee. Primul procedeu numit „prin găurire” (1) – constă în găurirea la nivelul de meristemă apicală, după care tulpina fiind înfășurată cu ață tehnică, în prealabil îmbibată cu soluție reactiv și învelită cu lipici, pentru a nu permite evaporarea ei. Al doilea procedeu numit „modul eprubetei” (2) – constă în coaserea zonei de creștere, iar capetele aței cu lungimea de 6-10 cm, fiind introduse în eprubetă cu soluție reactiv. Al treilea procedeu numit „fără găurire” (3) – este asemănător primului procedeu, dar fără găurire.

Ca perioadă de tratare, a servit expozițiile timp de una și respectiv două nopți.

Ca metodă de dublare în condiții de laborator a servit metoda Deimling [8], care constă în germinarea semințelor până la faza, când coleoptilul va avea în medie 4 cm., după care se înlătură partea superioară a coleoptilului, iar plantulele se introduc în soluție colchicină de 0,06%+DMSO de 0,5%, pentru 12 ore. După tratare, plantulele se plantează în condiții de câmp. În calitate de martor au servit plante haploide netratate.

După tratare și până la faza de maturitate deplină, s-au efectuat observații fenologice, ce țin de dezvoltarea plantelor după tratare. Eficacitatea dublării s-a determinat după numărul de plante fertile și după numărul de plante, care după polenizare au produs boabe. Panicula s-a considerat fertilă, dacă după o singură colectare, cantitatea de polen este suficientă pentru polenizare. Fiecare plantă cu panicul fertil, s-a încercat de autopolenizat pentru obținerea boabelor, indiferent de numărul acestora.

Rezultate și discuții

Începând cu faza înfloririi, până la faza de maturitate deplină, în dependență de numărul de plante tratate, s-a determinat procentul de plante, care au produs polen și plante, care în rezultatul autopolenizării au format boabe normale (tabelul 1).

Corelația factorilor ca: modul, concentrația, și faza de tratare, pentru fiecare genotip în parte a influențat diferit dublarea plantelor haploide. Unicul factor, care nu a influențat considerabil a fost expoziția.

În baza rezultatelor obținute, s-a determinat că modul (1) la genotipul n(MK109 x Rf7), în dependență de concentrația reactivului și faza de tratare, a acționat diferit. Tratarea materialului la faza de 4 frunze cu soluție de 0,12%, a determinat obținerea valorii de 10,5 % a plantelor ce au produs boabe. La faza de 3 frunze s-a înregistrat o valoare de 5,3 %. Utilizarea concentrației de 0,06%, la faza de 3 frunze a influențat slab dublarea numărul de plante ce au produs boabe demonstrând valori de 2 ori mai mici decât a martorului, iar utilizarea aceeași concentrații la faza de 4 frunze nu a indus dublarea la nici o plantă tratată.

La genotipul n(Ku123 x Rf7), modul (1) prin utilizarea concentrației de 0,12% la faza de 3 frunze, a favorizat obținerea celei mai înalte valori a dublării - de 22,2%, iar la faza de 4 frunze de 19,4 %. Comparativ cu primul genotip, valorile înregistrate pentru genotipul n(Ku123 x Rf7), nu diferă esențial, de la o faza la alta.

Comparativ cu primul procedeu, utilizarea procedeeului (2) a influențat diferit dublarea haploizilor. Astfel, atât în cazul utilizării concentrației de 0,06%, cât și 0,12%, rezultatele variază considerabil de la o fază la alta și nu depășesc valorile înregistrate de martor.

Tabelul 1. Rezultatele tratării haploizilor cu colchicină de diferite concentrații, în condiții de câmp și laborator.

Genotip	Modul de tratare	Concentrația reactivului %	Faza de tratare (frunze)	Nr. de plantule tratate	Nr. de plante	
					Cu panicul fertil %	Care au format boabe normale %
	<i>control</i>			31	25,8	6,5
N(MK109 x Rf7)	<i>„prin găurire”</i>	0,06	3 fr.	34	8,8	3,2
			4 fr.	37	13,5	0
		0,12	3 fr.	19	10,5	5,3
			4 fr.	38	31,6	10,5
	<i>„modul eprubetei”</i>	0,06	3 fr.	26	42,3	11,5
			4 fr.	25	36	4
		0,12	3 fr.	34	29,4	5,9
			4 fr.	42	26,2	2,4
	<i>control</i>			34	26,5	11,8
N(Ku123 x Rf7)	<i>„prin găurire”</i>	0,12	3 fr.	36	36,1	22,2
			4 fr.	36	41,7	19,4
	<i>„modul eprubetei”</i>	0,12	3 fr.	18	22,2	5,6
			4 fr.	26	11,5	0
	<i>„fără găurire”</i>	0,12	3 fr.	31	9,7	3,2
			4 fr.	46	17,4	4,5
SPC4	Metoda Deimling	0,06		129	10,07	8,5

Dintre procedeele testate, cele mai mici rezultate s-au obținut în cazul utilizării procedului (3). Acest procedeu de tratare a provocat multe aberații în dezvoltarea plantelor, iar procentul de plante fertile este cu mult mai mic decât martorul.

De asemenea, atrage atenția și procentul destul de mare al dublării spontane al martorului 6-12%. Posibil să fie influențat de genotipul Rf7, care este prezent în ambele încrucișări. Acest genotip și-n cercetări anterioare a demonstrat dublare spontană ridicată a cromozomilor. Dacă într-adevăr această linie influențează dublarea cromozomilor, atunci elaborarea metodelor genetice de dublare, fără reactivi de dublare, ar fi foarte efectivă.

După cum am menționat mai sus, paralel cu cercetarea procedeele de dublare a haploizilor în condiții de câmp, a fost utilizată metoda Deimling [8]. Aceasta este una din cel mai des utilizate metode de dublare în condiții de laborator, iar în cercetarea noastră ea a servit ca grad de comparație dintre diferite metode de dublare. Avantajul de bază al acestei metode este procentul înalt al plantelor ce produc boabe, din numărul mic de plante care supraviețuiesc după tratare. În cazul nostru din 10,7 % de plante, care s-au dezvoltat normal după tratare și au format panicule fertile, 8,5 % de plante au produs boabe.

Totuși, cel mai mare dezavantaj al acestei metode rămâne procentul înalt de plante care nu rezistă acțiunii reactivului de dublare. Acestea sau pier, sau formează aberații care nu permit dezvoltarea normală a plantelor după tratare. De asemenea, pentru a

obține un rezultat eficient, această metodă necesită un volum enorm de lucru, ceea ce nu permanent este posibil.

Astfel, dintre procedeele de dublare a numărului de cromozomi, testate în condiții de câmp, cele mai efective s-au dovedit a fi:

1. Tratarea materialului prin procedeul (1) cu colchicină de 0,12% în fazele de 3 și respectiv 4 frunze. Frecvența dublării variază de la 10% la genotipul n(MK109 x Rf7) până la 22% pentru genotipul n(Ku123 x Rf7).

2. Tratarea după procedeul (2) cu concentrația de 0,06%, în faza de 3 frunze a demonstrat o valoare a dublării de 11,5% în cazul genotipului n(MK109 x Rf7). De altfel, acest mod este mai dificil de realizat, dar poate demonstra o eficacitate mult mai înaltă, dacă concentrația reactivului se va micșora.

3. Dublarea spontană în încrucișările cu genotipul Rf7 a demonstrat o frecvență a dublării de 6,5% în cazul genotipului n(MK109 x Rf7) și valori de 11,8% pentru n(Ku123 x Rf7)

Bibliografia

1. *Antoine-Michard S., Beckert M.* Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. // *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 1997. V. 48. 203-207.
2. *Bajer A.S., Mole-Bajer J.* Drags with colchicines like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules. // In: Sorfer (ed) *Dynamic aspects of microtubule biology*. Ann NY Acad. Sci., 1986. V. 466. 767-784
3. *Beckert M.* Advantages and disadvantages of use of in vitro in maize produced DH maize plants. // In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, V. 23. Maize (ed. By Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berla Heidelberg, 1994. 201-213
4. *Belling J., Blakeslee A.F.* The assortment of chromosomes in tetraploid *Datura S.* // *Amer. Nat.* 1924. V. 58. 60-70.
5. *Chalyk S.T.* Use of maternal haploid improved maize inbred lines. // *Maize Genetic Cooperation News Letter*, 1999. V. 73. 73-77.
6. *Chase S.S.* Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). // *The Botanical Review*, 1969. V. 35. 117-167.
7. *Coe E.H.* A line of maize with high haploid frequency. // *Amer. Nat.* -1959, V.93. 381-382.
8. *Deimling S., Rober F.K., Geiger H.H.*, Methodik und genetic der in vivo Haploideninduktion bei Mais. // *Vortr.* 1997, *Pflanzenzuchtg* 38, 203-224
9. *Esser K.*, Eine Eintauchmethode zur Colchicinebehandlung. // *Der Zuchter*, 1953. V.23. 148 p.
10. *Faris N.M., Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S.* et al. Induction and regeneration of cucumber (*Cucuber sativus* L.) doubled haploids. // *Teoret. Appl. Genet*, 1963. V.37. 181-186.
11. *Gerrish E.E* Studies of the monoploid method of producing homozygous diploids in *Zea mays*. // Ph. D. Thesis. Univ. of Minnesota. Minneapolis, 1956. 140 p.
12. *Nebel B.R.* Mechanism of polyploidy trough colchicine. // *Nature*, 1937. V. 140. 1101 p.
13. *Nikolova V., Niemierowicz -Szczutt K.* Diploidization of cucumber (*Cucumis Sativus* L.) haploids by colchicine treatment. // *Acta Soc. Bot. Pol*, 1996. V. 65. 7p.
14. *Seaney R.R.* Studies on monoploidy in maize. // Ph. D. Thesis. Cornel Univ., Ithaca. New York, 1955. 160 p.
15. *Shaver D.L.* A successful colchicines method for *Zea*. // *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1964. V. 38. 21-22.
16. *Veilleux R.E.* haploidy in important crop plants-potato. // In: *In vitro haploid production in higher plants* (Eds.) Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.F. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. Boston. London, 1996. V. 3. 37-49.
17. *Wan Y., Duncan D.R., Rayburn A.I.* The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. // *Theor. Appl. Genet.*, 1991. V. 81. 205-211.
18. *Zeilinga A.E., Schouten H.H.* Poliploidy in garten Tulips. The production of tetraploids. // *Euphytica*. 1968. V. 17. 303-310.

19. Бахарев А.Л. Эффективный метод получения тетраплоидов озимой ржи. // В: Физиологические и генетические основы селекции. Саратов, 1984. 111-119.
20. Гуляев Г.В., Мальченко В.В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции, семеноводству и семеноведению. М: Россельхозиздат, 1975. 215 с.
21. Забирова Э.Р., Чумак М.В., Шацкая О.А., Щербак В.С. Технология массово ускоренного получения гомозиготных линий. // Кукуруза и сорго, 1996. № 4. 17-19.
22. Юдин Б.Ф. К проблеме диплоидизации гаплоидов. // Тр. Биол. Ин-та СО АН СССР, 1976. Выпуск. 30. 136-145.

HETEROZISUL ÎNREGISTRAT LA HIBRIZI F₁ DE SALVIA SCLAREA L.

**Gonceariuc Maria¹, Cotelea Ludmila¹, Balmuș Zinaida¹, Gille Elvira²,
Gita Georgiana², Spac A³**

¹*Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor, Academia de Științe a Moldovei*

²*Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice București /
Centrul de Cercetări Biologice "Stejarul" Piatra Neamt, Romania*

³*Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa", Iași, România*

Fenomenul heterosis este utilizat cu succes în ameliorarea multor specii de plante alogame, inclusiv a serlaiului (*Salvia sclarea* L.), specie aromatică și medicinală valoroasă datorită uleiului esențial pe care îl conține în inflorescențe și care este foarte apreciat în industria parfumeriei, medicină, industria de fabricare a vinurilor de tip muscat etc. Pentru Moldova specia este importantă prin faptul că uleiul esențial și concretul fabricat aici sunt produse destinate pentru export.

În rezultatul cercetărilor efectuate au fost creați hibrizi simpli de *Salvia sclarea* L., ce manifestă heterosis nu numai în generația F₁, ci și în generațiile F₂ – F_n [1,2,3,5], or cercetările anterioare au demonstrat că crearea soiurilor noi de proveniență hibridă cu perioada de maturizare diferită, conținut ridicat de ulei esențial, productivitate înaltă este mai eficientă, folosind în acest scop hibrizii complecși: dubli, backcross și în trepte care manifestă heterosis la un șir de caractere cantitative [3]. În acest context, materialul prezentat este dedicat rezultatelor obținute recent în crearea genotipurilor hibride perspective și evaluarea valorii heterozisului la caracterele cantitative care influențează direct productivitatea și calitatea.

MATERIAL ȘI METODE

Materialul vegetal folosit este reprezentat de 14 hibrizi F₁ de *Salvia sclarea* simpli, tripli, dubli și în trepte, precum și formele parentale ale acestora – linii consangvinizate S₆-S₁₂ de proveniență genetică și geografică diferită, hibrizi F₂-F₇, B₄-B₅ de diferită complexitate.

Uleiul esențial s-a obținut prin hidrodistilare în aparate Ginsberg, iar conținutul uleiului s-a recalculat la substanță uscată. După distilare uleiul esențial s-a „uscat” cu Na₂SO₄ și s-a păstrat în congelator. Efectul heterosis a fost calculat în procente în raport cu ambele forme parentale ale fiecărui hibrid la următoarele caractere cantitative: talia plantei, lungimea inflorescenței, numărul de ramificații ale inflorescenței de ordinul I și II, conținutul de ulei esențial, numărul de verticile pe spicul central al paniculului.