

GENETICA, BIOLOGIA MOLECULARĂ ȘI AMELIORAREA

UTILIZAREA PLANTELOR HAPLOIDE ÎN AMELIORAREA POPULAȚIILOR SINTETICE LA PORUMB

V. Rotarencu¹, G. Dicu², M. Mihailov¹, S. Maslobrod¹, M. Sarmaniuc¹, A.
Jacotă¹

¹ *Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM*

² *Procera Agrochemicals SRL, Muncii 11, Fundulea, Calarași, 915200, România.*

Introducere

Porumbul este una din culturile cerealiere cele mai răspândite în agricultura mondială, fiind utilizat atât în scopuri alimentare, cât și în calitate de cultură furajeră și materie primă industrială.

La cultivarea porumbului intensiv se utilizează efectul de heterozis – vigoarea hibridilor din prima generație F_1 [17]. Producerea hibridilor și distribuirea semințelor hibride a devenit o industrie profitabilă în agricultură.

Crearea hibridilor de porumb este un proces destul de îndelungat - numai pentru obținerea liniilor homozigote, care reprezintă formele parentale ale hibridului, este nevoie de 5-7 ani, pentru testarea și omologarea hibridului în zona respectivă se adaugă încă cel puțin 4 ani.

În medie, la crearea hibridilor se utilizează una din zece mii de plante S_2 sau S_3 , fapt ce denotă dificultatea obținerii noilor linii [11]. Așadar, frecvența liniilor valoroase în mare parte depinde de calitatea materialului inițial. De regulă, ca material inițial în ameliorare servesc populațiile sintetice heterogene.

În ameliorarea populațiilor sintetice se utilizează diverse metode de selecție recurentă. Elementele de bază ale selecției recurente constau în selectarea din populația inițială, neomogenă din punct de vedere genetic, a genotipurilor cu caractere de interes și repolenizarea lor ulterioară. În baza recombinărilor obținute se creează noi populații sintetice cu fondul genetic ameliorat. Unele variante ale metodei de selecție recurentă se utilizează pentru ameliorarea însăși a populației, altele pentru obținerea efectului maxim de heterozis la nivel de inter-populație – selecția reciproc-recurentă.

Ameliorarea populației se realizează în baza majorării frecvenței genelor favorabile cu efecte nealelice [11]. Dar interacțiunile genelor alelice (dominanta și supra-dominanta), împiedică semnificativ evidențierea și selectarea genotipurilor favorabile, din această cauză eficacitatea metodelor de selecție recurentă fiind destul de scăzută, prezentând în medie o creștere a productivității boabelor cu 4% la un ciclu de selecție [12].

Pentru sporirea eficacității metodei de selecție recurentă, s-a propus utilizarea plantelor haploide sau dihaploide. În asemenea mod dispăre posibilitatea interacțiunilor

alelice a genelor, iar selectarea genelor cu efecte nealelice devine mult mai eficientă [6,8,10].

Utilizarea în masă a haploizilor în ameliorarea porumbului a devenit posibilă datorită creării inductorilor a haploizilor matroclinici, cu un potențial de inducere a haploizilor de aproximativ 10%, comparativ cu 0,1% – apariția pe cale naturală a haploizilor la porumb [2,15,19].

Plantele haploide, din cauza dereglărilor în procesul meiozei, nu sunt capabile să producă polen, sunt androsterile, dar în cazul polenizării lor cu polenul plantelor diploide, se obține un număr oarecare de semințe normale ($2n$). Această capacitate a haploizilor permite utilizarea lor în procesul de ameliorare fără dublarea numărului de cromozomi [1,9].

Primele rezultate practice de aplicare a plantelor haploide în schema selecției recurente au fost prezentate de către S. Chalyk și V. Rotarenco. S-a demonstrat că selecția la nivelul plantelor haploide contribuie la sporirea esențială a eficacității selecției recurente la populațiile sintetice SP și SA, cu adaos la un ciclu de selecție la productivitatea boabelor de 13, respectiv, 12% [4, 5, 16].

Utilizarea în continuu a metodei respective, numită *selecția recurentă haploidă*, a permis ameliorarea semnificativă a populațiilor după producția de boabe și unele caractere calitative.

Unul din scopurile prezentei lucrări, este determinarea nivelului de ameliorare a populațiilor SP și SA, prin compararea lor cu hibridi omologați. Un alt scop propus, este prezentarea schemei selecției reciproc-recurente cu utilizarea plantelor haploide și derularea primului ciclu.

Materiale și metode

Crearea populațiilor sintetice. Populația sintetică SP a fost obținută ca rezultat al încrucișării a patru linii: P346C, ms1334, Co125, MK-01y și a soiului Englezesc timpuriu. Încrucișările au fost efectuate în așa măsură, ca populația SP să conțină 37,5% din germoplasma liniei MK-01y. Schema de încrucișare a fost următoarea: [(P346C x Englezesc timpuriu) x (ms1334 x MK-01y)] x (Co125 x MK-01y) [3].

A doua populație sintetică SA a fost creată în baza încrucișării a patru linii: N384M, P092, Rf7 și MK159. În cazul de față, încrucișările au fost efectuate în așa fel încât populația SA să conțină 50% din germoplasma liniei P092. A fost utilizată următoarea schemă de încrucișare: (N384M x P092) x [P092 x (Rf7 x MK159)] [3].

Obținerea haploizilor. Pentru obținerea haploizilor, s-a utilizat inductorul haploizilor matroclinici MHI - *Moldavian Haploid Inducer* [2]. Acest inductor permite obținerea boabelor cu embrion haploid cu o frecvență de 6-8%, practic, din orice genotip. Inductorul posedă gene marker cu colorație antocianică – *A1, B1, C1, P1, R1-nj*, care permit identificarea haploizilor, atât în faza de boabe mature, cât și în diferite faze vegetative de dezvoltare.

Selecției recurentă haploidă. Schema selecției recurente haploide constă din trei etape (Fig. 1).

Etapele:

Obținerea haploizilor din populația inițială (C_0)

Cultivarea haploizilor, polenizarea lor cu polen de la plantele diploide (C_0).

Recombinarea și înmulțirea rezultatului primului ciclu de selecție (C_1)
 Selecția s-a realizat la nivel haploid, caracterele de selecție au fost lungimea știuletelui și numărul rândurilor de boabe.

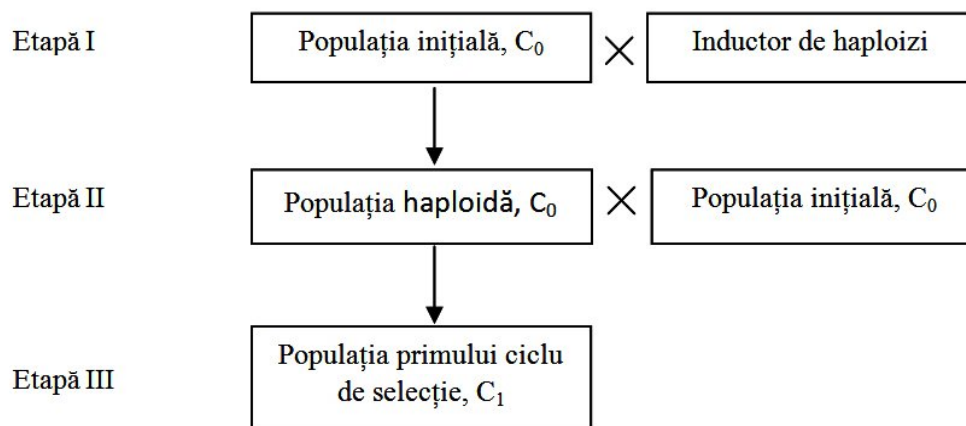


Fig.1. Etapele selecției recurente haploide

În populația sintetică SP, au fost efectuate patru cicluri (C_4) de selecție recurentă haploidă și trei cicluri (C_3) în populația SA.

Testarea populațiilor și hibrizilor. În testare au fost utilizate populațiile SPC_4 (FAO-330) și SAC_3 (FAO-290). În calitate de martori au servit hibrizii Moldavschii 291 MRf (FAO-290) și Porumbeni 359 AMRf (FAO-350), la fel a fost testat hibridul dintre populații $SPC_4 \times SAC_3$, și hibridul B73 x Mo17 (FAO-600).

Cercetările au fost efectuate pe câmpurile experimentale ale firmei „Procera Agrochemicals” SRL, Fundulea, România, în trei repetiții, în condiții de irigare. Fiecare genotip a ocupat o suprafață de 10 m², în două rânduri cu o lungime de 7 m cu densitatea de 60 mii de plante/h.

După înflorire, s-a măsurat înălțimea plantelor, iar după recoltare s-a determinat lungimea știuleților și numărul rândurilor de boabe. Recolta a fost estimată la umiditatea boabelor nu mai mare de 14% și s-a realizat conform masei boabelor de pe fiecare parcelă, cu recalcularea ulterioară pentru un hectar.

Conținutul de proteină și de ulei din boabe a fost analizat cu Sistemul pentru determinarea calitatii boabelor INFRATEC 1241.

Selecția reciproc – recurentă haploidă. Schema selecției reciproc-recurente haploide prevede testarea hibrizilor, a haploizilor și generației S_1 , obținuți de la fiecare plantă a populației sintetice (Fig. 2).

Etape:

Obținerea haploizilor din populația inițială (C_0), încrucișarea ei cu linia tester și autopenizarea.

Testarea hibrizilor, selecția în populația haploidă și încrucișarea plantelor haploide cu generația S_1 .

Recombinarea și înmulțirea rezultatului primului ciclu de selecție (C_1).

Pentru obținerea semințelor hibride, cu polenul colectat de la o plantă a populației SA au fost polenizate două plante ale testerului – linia MK-01y, iar știuletele plantei

respectiv a fost polenizat cu inductorul haploizilor MHI, după 48 ore s-a efectuat autopolenizarea acestei plantei. Ca rezultat, de la fiecare știulete s-au obținut, atât boabe cu embrion haploid (în medie 15 boabe per știulete), cât și diploid, în urma autopolenizării.

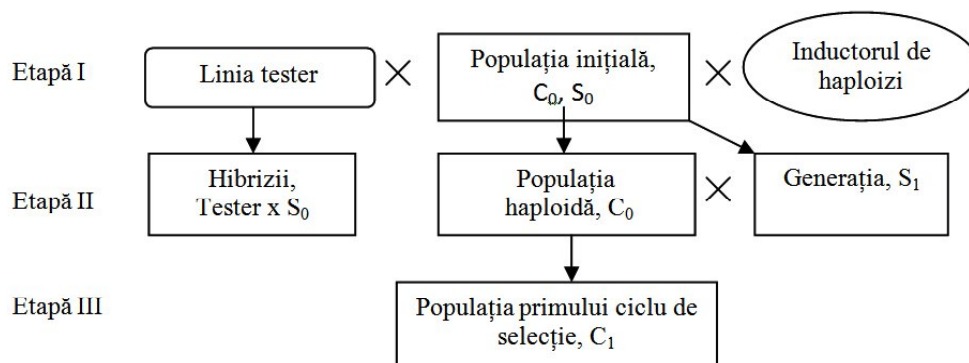


Fig.2. Etapele selecției reciproc-recurente haploide

Diferențierea boabelor, obținute ca rezultat al încrucișării cu inductorul și al autopolenizării, s-a realizat în baza expresiei genei marker *RI-nj*, care manifestă colorarea stratului aleuronic al endospermului și embrionului [13,14].

Derularea primului ciclu de selecție reciproc-recurentă haploidă. Cercetările au fost efectuate în câmpurile Institutului de Genetică și Fiziologia Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei. În trei repetiții au fost semănate 101 combinații hibride dintre populația SA și testerul MK-01y, la fel și doi hibrizi martori – Moldavschi 291 MRf (FAO-290) și Porumbeni 359 AMRf (FAO-350). Fiecare genotip al generației S_1 și haploizilor a ocupat o parcelă de un rând cu o suprafață de 5 m².

Plantele haploide și generația S_1 obținute de la o plantă a populației SA au fost încrucișate (♀ haploizi x ♂ S_1).

După înflorit, s-au determinat parametrii morfologici ai hibrizilor, generației S_1 și haploizilor.

După recoltare, s-au determinat parametrii știuleților și producția de boabe.

Analiza statistică. Limita semnificativă a diferenței (LSD) și corelația caracterelor a fost determinată după Snedecor G.W. [18].

Rezultate și discuții

Testarea populațiilor și a hibrizilor. Rezultatele testării au scos în evidență diferențe semnificative între populații – SPC_4 și SAC_3 . Producția de boabe la populația SPC_4 (97,3 q/h) a fost aproape de două ori mai mare decât la populația SAC_3 (51 q/h) (tab. 1.)

Producția obținută de populația SPC_4 a fost la nivelul hibrizilor martori – Moldavschi 291MRf (100,6 q/h) și Porumbeni 359 AMRf (98 q/h), mai mult decât atât, după unele caractere populația SPC_4 depășea substanțial acești hibrizi.

Hibridul obținut la încrucișarea populațiilor SPC_4 și SAC_3 după producția de boabe nu depășea semnificativ populația SPC_4 . Cu alte cuvinte, comparând hibridul cu forma

parentală superioară nu s-a constatat efectul de heterozis, cu excepția înălțimii plantei.

Hibridul B73 x Mo17 s-a caracterizat prin cea mai ridicată producție (113 q/h), însă din cauza diferenței semnificative după perioada de vegetație – FAO - 600, acesta nu poate fi utilizat în calitate de martor, fiind inclus în testările noastre ca genotip model, care se utilizează frecvent în cercetările de ameliorare la porumb.

Tabelul 1. Parametrii caracterelor cantitative ale populațiilor și a hibridilor (Fundulea, România)

Genotip	Producția de boabe, q/h	Lung. știul., cm.	Nr. rânduri boabe, buc.	Înălțimea plantei, cm.	Masa 1000 boabe, g.	%, proteină	%, ulei
SPC4	97,3	18,0	17,7	298,2	310	10,9	4,7
SAC3	51,0*	15,7*	13,7*	212,8*	244	12	5,3
SPC4 x SAC3	97,6	18,0	16,9	309,2^	316	10,5	5,0
Moldavschi 291MRf	100,6	19,2	15,0*	297,9	340	9,9	4,4
Porumbeni 359 AMRf	98,0	18,1	14,5*	260,3*	350	10,2	4,4
B73 x Mo17	113,0^	20,0	15,5*	306,0^	334	9,4	4,5
LSD (0,05)	9,97	2,73	0,82	8,69			

* semnificativ ($P < 0,05$) cedează populației SPC₄
 ^ semnificativ ($P < 0,05$) superioară populației SPC₄

După masa a 1000 de boabe, hibridii studiați depășeau populațiile, însă după conținutul de proteine și ulei nu s-au constatat diferențe majore.

Astfel, s-a demonstrat că utilizarea selecției recurente haploide permite o ameliorare vădită a populațiilor sintetice – populația SPC₄ după producția de boabe nu cedează hibridilor F₁.

Selecție reciproc-recurentă haploidă. Evaluarea recoltei a 101 hibridi MK01y x SA a scos în evidență că 13 dintre aceștia depășeau semnificativ hibridul Moldavschi 291MRf și 68 – hibridul Porumbeni 359 AMRf. După lungimea știuletelui, 29 hibridi depășeau semnificativ primul martor și 91 – al doilea, după numărul rândurilor de boabe acest raport a fost de 97 și 54, după lungimea plantei – 41 și 91, iar după masa a 1000 de boabe – 26 și 9, respectiv (tabelul 2.).

Pentru primul ciclu al selecției reciproc-recurente haploide au fost selectate 20 genotipuri – descendenții plantelor populației SA (haploizii x S₁), care au fost utilizate ca forme paterne ale 20 hibridi (MK01y x SA) cu recolta cea mai înaltă.

Tabelul 2. Parametrii caracterelor cantitative ai hibrizilor (Chișinău, Moldova)

Genotip		Productia de boabe, q/h	Lung. știul., cm.	Nr. rânduri boabe, buc.	Înălțimea plantei, cm.	Masa 1000 boabe, g.
Hibrizii MK01xSA	în mediu	54,7	18,6	14,4	207,5	272,7
	max.	64,6	20,5	16,2	228,7	339,8
	min.	42,7	15,7	12,9	187,9	230,6
Moldavschi 291MRf		59,4	19,2	13,2	209,4	287,0
Porumbeni 359 AMRf		53,1	17,3	14,4	175,0	303,4
LSD (0,05)		6,8	10,4	1,0	9,3	

Conform coeficientului de corelație, s-a atestat lipsa unei dependențe directe dintre producția de boabe a generației S_1 și a hibrizilor (coeficientul de corelație 0,17), corelația după masa a 1000 boabe în acest tandem, de asemenea, a fost nesemnificativă (0,08). După celelalte caractere studiate s-a constatat o corelație semnificativă (tab. 3.).

Tabelul 3. Corelația caracterelor cantitative

Caracter	S_1 - Hibrizi	Haploizi - S_1	Haploizi - Hibrizi
Productivitatea	0,17	-	-
Lungimea știuletelui	0,34**	0,26	0,25
Nr. rândurilor de boabe	0,59***	0,41*	0,47**
Înălțimea plantei	0,27**	0,35*	0,43*
Masa a 1000 de boabe	0,08	-	-

Corelația semnificativă la nivelul de probabilitate * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Analiza numărului rândurilor de boabe și înălțimea plantei a permis să constatăm o corelație semnificativă în tandemul haploizi–generația S_1 și haploizi–hibridi. Coeficientul de corelație a productivității semințelor la hibridi și numărul rândurilor de boabe la haploizi a fost de 0,36 (semnificativ la 0,05%). Aceasta presupune că selecția după caracterele știuletelui la plantele haploide ar putea avea un efect pozitiv asupra capacității combinative.

Concluzii

Selecția efectuată la nivelul plantelor haploide, contribuie nu doar la majorarea eficienței selecției recurente, dar și la ameliorarea semnificativă a populațiilor sintetice, care după recolta boabelor pot atinge valorile hibrizilor F_1 . Mai mult ca probabil, asemenea efect se obține și datorită selecției naturale – la nivelul haploid se expresează toate genele atât dominante, cât și cele recesive, iar mutațiile nefavorabile se elimină pe cale naturală.

După părerea noastră, utilizarea plantelor haploide în ameliorarea capacității combinative a populațiilor poate avea perspectivă din punct de vedere practic și teoretic. Utilizarea haploizilor permite evidențierea parțială a contribuției interacțiunilor alelice și a efectelor nealelice asupra capacității combinative. Astfel, e posibil de a efectua o

evidența mai riguroasă a selecției, reieșind din scopul ameliorării populațiilor, cât și studiul fenomenului de heterozis.

Bibliografie

1. *Chalyk S.T.* Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding//*Euphitica*, 79, 1994, 13-18
2. *Chalyk S.T.* Creating new haploid-inducing lines of maize//*Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 73, 1999, 53-54
3. *Chalyk S.T.* Method of haploidy in maize genetics and breeding//*Chisinau, IGAS. Pub. GAUM*, 2003, 179
4. *Chalyk S.T., Rotarenco V.A.* Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize//*Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 73, 1999, 56-57
5. *Chalyk S.T. and Rotarenco V.A.* The use of matroclinous maize haploids for recurrent selection//*Russ J. Genetica*, 2001. V. 37, 1382-1387
6. *Chase S.S.* Production of homozygous diploids of maize from monoploids//*Agron.J.* 44, 1952, 263-267
7. *Chase S.S.* Monoploids and derivatives of maize (*Zea mays* L.)//*Botanical review*, 1969, V.35, 117-167
8. *Choo T.M., Kannenberg L.W.* Relative efficiencies of population improvement methos in corn. A simulation study//*Crop.Sci.*, 19, 179-184
9. *Geiger H.H., Braun M.D., Gordillo G.A., Koch S., Jesse J. and Kretzfeldt, B.* Variation for female fertility among haploid maize lines//*Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 80, 2006, 28
10. *Griffing B.I.* Efficiency changes due to use of doubled haploids in recurrent selection methods//*Theoretical and Applied Genetics*, 1975, V.46, 367-386
11. *Hallauer A.R., Miranda J.B.* Quantitative genetics in maize breeding//*Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa*, 1981, 468
12. *Hallauer A.R., Russell W.A., Lamkey K.R.* Corn breeding. *Agron.*, 1988, Midison, WI, 63-564
13. *Nanda D.K. and Chase S.S.* An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.)//*Crop Sci*, 6, 1966, 213-215
14. *Neuffer M.G., E.H. Coe S.R.* Mutants of maize//*CSHL Press, New York, USA*, 1997
15. *Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H.* *In vivo* haploid induction – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding// *Maydica*, 50, 2005, 275-283
16. *Rotarenco V.A. Chalyk S.T., Eder J.* Utilization of maize haploid plants in a recurrent selection procedure// *J. Genetics and Breeding*, 58, 2004, 61-72
17. *Shull G.H.* Beginnnngs of the heterosis concept//*Heterosis, Iowa State Col. Press, Ames*, 1952
18. *Snedecor G.W., Cochran W.G.* Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. 5th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1961, 504 p.
19. *Tyrnov V.S., Zavalishina A.N.* Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize//*Dokl. Akad.Nauk, SSSR*, 276, 1984, 735-738