

ASPECTE PRIVIND ESTIMAREA GRADULUI DE STERILITATE A LINIILOR DE FLOAREA-SOARELUI

*Maria DUCA, Angela PORT, Alexei LEVIȚCHI, Tudor ROTARU**

LCȘ „Securitate Biologică”

**AȘP „Magroselect” SRL (or. Soroca)*

Monitoring of the seed quality at different stages of plant breeding at sunflower represents a very important element in obtaining high yield hybrids based on CMS-Rf genetic system. Sunflower represents a protandric plant with a single terminal inflorescence which contains 700-3000 individual hermaphrodite flowers, exposed on the calathidium, making manual emasculation almost impossible. That's why the utilization of the male sterility was indispensable and necessary for the obtaining of the high level of hybridization at all the stages of sunflower breeding. Wide utilization of maternal lines, with cytoplasmic male sterility, and of paternal lines, with fertility restoring genes Rf, lead to the necessity to observe the stability and homogeneity of parental genotypes. Thus, for the paternal genotypes it is important to verify the presence and the state of Rf genes, but maintaining male sterility is verified by the level of sterility control. Utilization of PCR-based methods with specific primers allows controlling genotype quality.

Androsterilitatea reprezintă o caracteristică larg răspândită în regnul vegetal, fiind observată la peste 150 plante [1] și constituie incapacitatea plantelor de a produce polen funcțional, drept rezultat al blocării procesului de microsporogeneză la diverse etape – premeiotică [2] sau postmeiotică [3] – ale acestuia. Sterilitatea masculină la floarea-soarelui a fost descoperită în 1929 de către A.I. Kuțov [4].

Se cunosc mai multe tipuri de androsterilitate (AS), precum:

- ✓ AS nucleară, determinată de genele recesive *ms*, care se moștenesc mendelian, și este înlănțuită cu genele antocianice [5];
- ✓ AS indusă sau modificalională, prin aplicarea exogenă a diferitelor gametocide, în special a giberelinelor [7], care s-a folosit la prima etapă de ameliorare a florii-soarelui la heterozis;
- ✓ AS citoplasmatică (ASC), care la floarea-soarelui este de natură aloplasmică, fiind obținută experimental pentru prima dată în Franța în rezultatul hibridizării interspecifice între speciile sălbatice filogenetic distanțate *H.petiolaris* și *H.annuus* [8].

Acest tip de androsterilitate, numit PET1, este utilizat pe larg în practica de ameliorare a florii-soarelui. Datorită folosirii aproape exclusive a acestei surse de androsterilitate citoplasmatică (ASC) pentru obținerea de semințe hibride, toți hibridii din cultură sunt puternic înrudiți, cel puțin în ceea ce privește citoplasma lor. Însă, exploatarea unui singur tip de ASC pentru producerea hibridilor duce la unificarea germoplasmei și la reducerea bazei genetice a materialului ameliorativ, ceea ce determină pierderea unor caractere agronomice valoroase, creșterea vulnerabilității față de condițiile variate ale mediului [9] și generalizează dificultăți legate de restaurarea ineficientă a androfertilității [10].

Astfel, a fost stabilită influența fotoperioadei asupra stabilității ASC și restaurării androfertilității la porumb [11]. Influența factorilor de mediu s-a atestat, de asemenea, asupra dezvoltării polenului la hibridii F₁, creați în baza diferitelor tipuri de ASC [12-15]. Creșterea gradului de sterilitate la liniile A (ASC) și liniile B (menținătoare) odată cu mărirea temperaturii (33-36°C) și a duratei zilei s-a constatat la bumbac [16].

La floarea-soarelui s-a demonstrat că, în dependență de sursa de ASC, plantele se caracterizează printr-o normă de reacție și o stabilitate diferită a gradului de sterilitate față de condițiile mediului extern [17,18]. A fost stabilită creșterea numărului de plante sterile și un nivel al variabilității caracterului cercetat mai mare la floarea-soarelui la testarea hibridilor în semănatul de vară, comparativ cu cultura obișnuită de primăvară [19], androsterilitatea de tip *lenticularis* fiind mai puțin stabilă. Christov (1993) [20] a evaluat performanțele agronomice pentru 9 genotipuri hibride, provenite din 13 surse de ASC, printre care și PET1, și a stabilit importanța efectelor nucleare și citoplasmice pentru caracteristicile biologice studiate: înălțimea plantelor, diametrul capului și conținutul în ulei (Tab.1). Principalele concluzii confirmă prevalența efectelor nucleare asupra celor citoplasmice și puternicele interacții nucleu-citoplasmă.

Tabelul 1

Efectele cauzate asupra anumitor caractere, determinate de citoplasma PET1

Caracterul afectat	Efectul observat	Exemple de alte tipuri de ASC cu efect similar
Cantitatea de sămânță	Efecte negative	ANN2, ANN4, PET2, MAX1
Înălțimea plantelor	Creșterea plantelor în înălțime	ANN1, ANN2, PET2
Conținutul în ulei	Efecte negative	ANL2, PET2
Perioada de înflorire	Creșterea duratei înfloririi	ANL2, ANN1, ANN4, ANO1, BOL1, MAX1

Efectele liniilor androsterile asupra unor caractere de importanță agronomică sunt în general reduse, uneori determinând efecte negative.

A fost stabilită susceptibilitatea unor tipuri de ASC la diferite specii față de patogeni. La *Pennisetum glaucum* a fost demonstrată susceptibilitatea înaltă a majorității liniilor cu ASC la atacul *Claviceps fusiformis* [21], iar epifitotiile largi, provocate de *Helminthosporium maydis* și *Phyllosticta maydis*, care au adus pierderi globale de producție agricolă, reduc practic totalmente utilizarea androsterilității citoplasmice de tipul Texas (T) în crearea hibridilor de porumb [22-24].

De aceea, una dintre problemele de bază ale amelioratorilor este diversificarea surselor de androsterilitate citoplasmică în crearea hibridilor și cultivarea hibridilor creați pe bază de diverse tipuri și surse de ASC [25,26].

Astăzi la floarea-soarelui sunt cunoscute peste 60 surse de sterilitate citoplasmică masculină [3,27], create în baza a cca 20 specii din flora spontană [28], care se deosebesc atât după mecanismul molecular de genereză [29], cât și după mecanismul hibridologic de restaurare a fertilității polenului în F₁ [19]. Aceste surse de androsterilitate citoplasmică pot și trebuie utilizate la crearea hibridilor înalt productivi. Însă, valorificarea acestora necesită cercetări ample atât în ce privește selectarea și identificarea liniilor restauratoare și a mecanismelor de restaurare a fertilității pentru aceste noi surse de ASC, cât și stabilitatea manifestării sterilității în dependență de diferiți factori biotici și abiotici, identificarea genelor mitocondriale asociate cu androsterilitatea citoplasmică, a nivelului de expresie și a gradului de sterilitate – cercetări necesare nu doar pentru tipizarea surselor existente, ci și pentru utilizarea lor eficientă pe sectoarele de hibridare.

Material și metode

Schema de analiză a inclus câte 50 semințe ale formelor maternelor a trei hibridi de perspectivă: *Drofa*, *Valentino*, *Xenia*. Materialul semincier a fost oferit de AȘP „Magroselect” SRL (or. Soroca).

ADN-ul a fost extras din plantule etiolate germinate timp de 4 zile (în termostat, 25°C) cu reactivul-kit DNA-zol (Gibco BRL) conform protocolului propus de producător. Calitatea și cantitatea de ADN utilizat ca matriță în reacția PCR a fost apreciată empiric prin electroforeză în gel de agaroză de 1%.

Amplificarea PCR a avut loc cu ajutorul primerilor specifici elaborați anterior prin programul de selecție Primer3 pentru *orfH522* (5'-3') [30]:

sens	GGCGCACTCTCTTTTCTGT
antisens	CTTGAATGGCAGTGGTGATG

Mediul de reacție PCR a inclus: 25-50 ng ADN; 50 pmol primeri; dNTP 200 μM; MgCl₂ 2,5 mM; 1X PCR tampon, Tag-DNA polimeraza (Rusia) 1,5 U/reacție, volumul total – 25 μl. A fost utilizat amplificatorul Corbett Thermal Cycler cu următorul program: 2 min. la 95°C urmat de 40 cicluri: 30 sec. la 95°C, 1 min. la 59°C, 2 min. și 30 sec. la 72°C. Ampliconii au fost analizați în gel de agaroză de 1,5% cu etidium bromid (0,4 μg/μl) în prezența markerilor ADN (100–1000 pb) conform protocolului standard [31].

În calitate de control negativ s-au utilizat semințele formelor paternelor fertile, cu gena Rf, iar controlul pozitiv l-au asigurat semințele hibride.

Testarea s-a realizat pe ADN-ul izolat dintr-o singură plantulă, incluzând în total 50 plantule pentru fiecare formă maternă, o plantulă de forma paternă în calitate de control negativ și o plantulă a genotipului hibrid de primă generație, pentru controlul pozitiv.

Rezultate și discuții

Ameliorarea plantelor de cultură, asistată de markeri moleculari, asigură eficiența și rapiditatea în realizarea programelor de selecție. Rezultatele prezentate în acest articol vizează estimarea gradului de sterilitate împreună cu evaluarea calității biologice a semințelor la formele maternelle de floarea-soarelui, utilizând tehnicile de biologie moleculară, combinate cu experimentul în câmp.

Fiind asociată cu prezența secvenței *orfH522* în genomul mitocondrial, androsterilitatea citoplasmatică poate fi evaluată cu succes cu ajutorul tehnicii PCR în baza primerilor specifici. Acest fapt a determinat realizarea cercetării și implementarea determinării ASC în baza primerilor *orfH522*, în același rând estimarea gradului de sterilitate pentru genotipurile de floarea-soarelui.

La prima etapă a cercetărilor, dat fiind faptul că, pentru a fi utilizată în programele de selecție, modalitatea de estimare a gradului de sterilitate trebuie să fie relativ ușoară, rapidă și exactă, a fost necesar de a adapta extragerea ADN și condițiile realizării tehnicii PCR. Pentru o estimare corectă a parametrilor se presupune analiza individuală a unui număr de cel puțin 50 de plante. De aceea, a fost utilizat kit-ul DNA-zol, care permite extragerea rapidă a ADN. Ulterior, a fost important de a verifica calitatea ADN extras, ceea ce a fost realizat prin electroforeza în agaroză 1% (Fig.1).

În rezultatul evaluării calității ADN-ului, pentru analizele ulterioare au fost selectate 42 probe ale genotipului matern *Xenia*, 33 probe pentru *Drofa* și 27 pentru *Valentino*. Calitatea ADN este importantă, deoarece influențează realizarea PCR. Probabilitatea ruperii ADN în zonele de interes nu va duce la amplificarea fragmentului *orfH522*. Primerii utilizați sunt lungi; fiind specifici, aceștia necesită fixare complementară cu fragmentul întreg al ADN-ului ce prezintă interes. Acești primeri produc un amplicon de 321 pb, care servește în calitate de marker al prezenței genei *orfH522* în genomul mitocondrial.

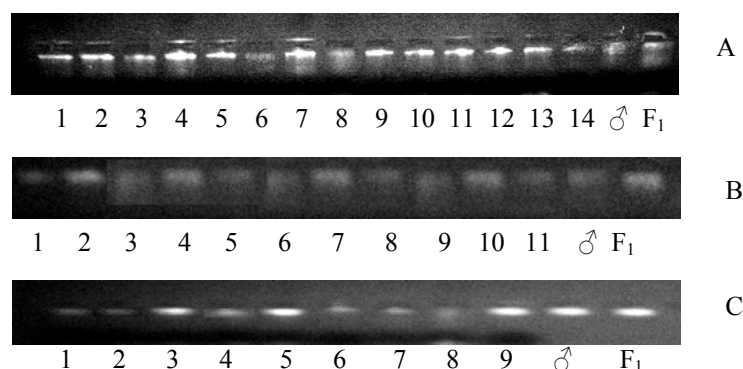


Fig.1. Electroforeza în gel de agaroză 1% a ADN total (4 µl) din trei familii de *Helianthus annuus* L.: *Xenia* (A); *Drofa* (B); *Valentino* (C). Cu cifre sunt indicate genotipurile ♀.

Dat fiind faptul că rezultatul obținut indică doar asupra prezenței restructurării în genomul mitocondrial, acesta nu permite diferențierea genotipurilor. Astfel, genotipurile hibride trebuie la fel să se caracterizeze prin prezența ampliconului de 321 pb, deoarece materialul genetic citoplasmatic se transmite de la linia maternă. Observațiile au demonstrat că toți hibridii se caracterizează prin amplificarea regiunii *orfH522*. Genotipurile paternelle, caracterizate prin gena nucleară *Rf* și lipsa *orfH522*, s-au manifestat (așa cum s-a așteptat) prin lipsa ampliconului.

Rezultatele amplificării au fost estimate prin gradul de sterilitate (GS) a liniilor maternelle, determinat prin următorul calcul:

$$GS = \frac{N_A}{N} \cdot 100,$$

unde: N_A – numărul de probe care au dat rezultat pozitiv; N – numărul total de probe analizate, exprimat în % (Tab.2).

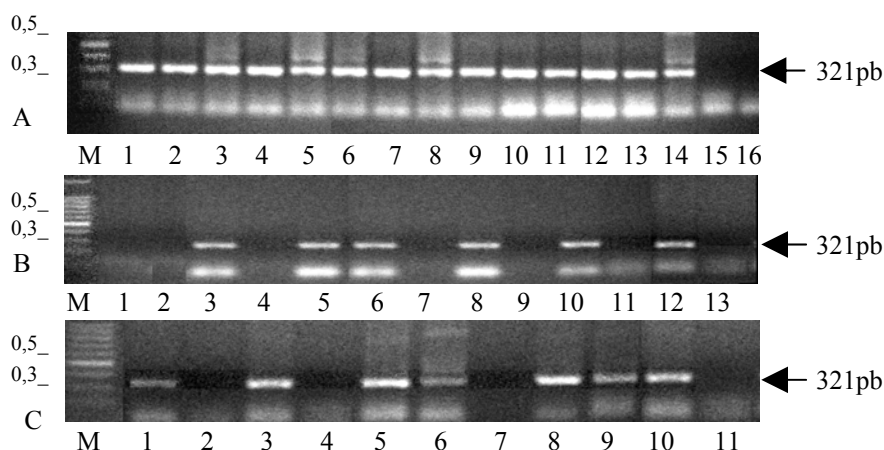


Fig.2. Electroforeza în gel de agaroză 1,5% a ampliconilor la trei familii de *Helianthus annuus* L.: *Xenia* (A) ♀- 1-14; F1-15; ♂-16; *Drofa* (B) ♀- 1-11; F1-12; ♂-13; *Valentino* (C) ♀- 1-9; F1-10; ♂-11.

Tabelul 2

Gradul de sterilitate (GS) estimat la diferite genotipuri maternelle în baza primerilor pentru *orfH522*

Genotipul	<i>Xenia</i>	<i>Drofa</i>	<i>Valentino</i>
Numărul total de probe	42	33	27
Numărul de probe amplificate	42	30	21
GS	100%	91%	78%

În cazul în care considerăm probele în calitate de un eșantion comun, se va obține un nivel de sterilitate medie a genotipurilor maternelle – de 89,7%.

Testările în câmp efectuate de selecționarii AȘP „Magroselect” SRL au demonstrat un grad de sterilitate între 71 și 96% pentru liniile cercetate (Tab.4). Toate liniile au manifestat un grad de sterilitate mai înalt, fiind determinat de condițiile de laborator. Aceasta poate fi explicat prin faptul că printre semințele acestor linii au existat impurități, precum plante netipice, care nu sunt caracteristice genotipului dat. Această presupunere este susținută și de valoarea purității genetice a liniilor studiate. În câmp liniile respective s-au caracterizat prin 80–94% de puritate genetică. Cercetările anterioare asupra estimării purității genetice a liniilor în baza heliantininei au demonstrat valori net mai înalte – între 96 și 100% (date nepublicate).

Tabelul 3

Puritatea genetică (GS) și de sterilitate (GS) estimată la diferite genotipuri maternelle în urma testării în câmp

Genotipul	Plante sterile tipice	Plante fertile tipice	Plante netipice	PG, %	GS, %
<i>Xenia</i>	41	2	2	95,6	95,4
	58	3	5	92,4	95,1
	-	-	-	-	-
				94,0	95,5
<i>Drofa</i>	66	8	5	93,7	83,5
	64	3	7	90,6	86,5
	60	2	8	88,6	85,7
				91,0	85,2
<i>Valentino</i>	66	3	24	74,2	71
	65	7	21	77,4	69,9
	75	15	12	88,2	73,5
				79,9	71,5

Deși analiza în baza parametrilor morfologici sau biochimici, precum spectrul heliantininei, nu determină direct gradul de sterilitate, aceasta este o caracteristică importantă a liniilor studiate. Totodată, trebuie de luat în considerație faptul că în urma testărilor din câmp se analizează toate plantele semănate în baza parametrilor lor morfologici. Aceasta poate determina atribuirea anumitor plante la nespecifice, fiind excluse din analiză. Testele de laborator se efectuează asupra semințelor, care se află la păstrare, astfel nefiind supuse acțiunii mediului înconjurător.

Dependența manifestării androsterilității citoplasmice de influența factorilor mediului înconjurător a denaturat corespunderea datelor obținute în câmp și în laborator. Astfel, estimarea corectă a gradului de sterilitate și utilizarea lui în programele de selecție este strict legată de cunoașterea acțiunii condițiilor mediului extern și, în special, a mecanismului de manifestare ASC.

Lipsa amplificărilor specifice ale anumitor probe este determinată, probabil, de problema tehnică, deoarece unele probe prezintă și amplificări nespecifice (Fig.2, A 3-5-6-8-14; C 5-6). Totodată, este necesară cercetarea mai largă a genotipurilor hibride pentru a verifica prezența genei pentru ASC în plasmonul lor.

Totuși, utilizarea tehnicii PCR în baza primerilor specifici prezintă mai multe avantaje față de aplicarea celor nespecifici. Tehnica RAPD implementată pentru testarea genotipurilor parentale, în general [32], și a celor feminine ASC, în special, este bazată pe un set de primeri [33], iar rezultatele posedă reproductibilitate joasă [34]. Astfel, primerii specifici pot fi utilizați cu succes la stabilirea prezenței androsterilității citoplasmice la liniile de floarea-soarelui. Reușita implementării unor astfel de mecanisme de control în programele de selecție asigură utilizarea cu succes a plantelor cu ASC, fiind un mijloc relativ ieftin de obținere a hibridilor înalt productivi cu puritate înaltă.

Referințe:

- Horn R., Friedt W. (1998). CMS mechanisms in sunflower - How many are there? - In: Plant Mitochondria: From Gene to Function, eds. I.M. Moller, P.Gardestrom, K.Glimelius, E.Glaser. - Backhuys Publishers, Leiden, p.79-82.
- Smart C., Monéger F., Leaver C.J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower // *Plant Cell*. - 1994. - Vol.6. - P.811-825.
- Ispas I. Aspecte moleculare privind citoplasma androsterilă PET1 de la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) // *Progrese în Biotehnologie*. - 2002. - Vol.2. - P.51-72.
- Mureșan T., Crăciun T. Ameliorarea specială a plantelor. - București: CERES, 1971. - 461 p.
- Анащенко А.В. Мужская стерильность у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.): Автореферат кандидатской диссертации. - Ленинград, 1968.
- Чайлахян М.Х., Хрянин В.Н. Пол растений и его гормональная регуляция. - Москва, 1982. - 176 с.
- Анащенко А.В. Особенности выращивания подсолнечника при химической кастрации // *Селекция и семеноводство*. - 1971. - №2. - С.36-38.
- Leclercq P. Une sterilité male utilisable pour la production d'hybrides simple de tournesol // *Ann. Amélior. Plantes*. - 1966. - Vol.16. - No2. - P.135-144.
- Dhillon M.K., Sharma H.C., Naresh J.S., Singh R., Pampapathy G. Influence of cytoplasmic male sterility on expression of different mechanisms of resistance in sorghum to *Atherigona soccata* (Diptera: Muscidae) // *Journal of Economic Entomology*. - 2006. - Vol.99. - No4. - P.1452-1461.
- Muhammad Sarwar Khan. Engineered male sterility // *Nature*. - 2005. - Vol.436. - No 7052, - P.783.
- Mural Koji, Tsunewaki Koichiro. Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat with *Aegilops crassa* cytoplasm // *Euphytica*. - 1993. Vol.67. - No1-2. - P.41-48.
- Дувик Д.Н. Влияние генотипа и условий внешней среды на цитоплазматическую стерильность пыльцы у кукурузы. - В сб.: Гибридная кукуруза. - Москва, 1969, с.42-62.
- Чалык Т.С., Белоус М.Т. Проявление жизнеспособности пыльцы кукурузы под влиянием стерильной цитоплазмы молдавского типа и генов восстановителей фертильности // *С/х биология*. - 1973. - Т.8. - №4. - С.523-531.
- Гонтаровский В.А. Изменчивость признака мужской фертильности у цитостерильной кукурузы в различных условиях окружающей среды // *Генетика*. - 1977. - Т.13. - №11. - С.1900-1909.
- Палилова А.Н. Цитоплазматическая мужская стерильность у растений. - Минск, 1969. - 208 с.
- Marshall D.R., Thompson N.J., Nicholls G.H., Patrick C.M. Effects of temperature and day length on cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium*) // *Australian Journal of Agricultural Research*. - 1974. - Vol.25. - P.443-447.
- Анащенко А.В. Генетика признака мужской стерильности у подсолнечника // *Генетика*. 1969. - Т.45. - С.43-48.
- Анащенко А.В. Достижения и перспективы селекции подсолнечника в мире. - Москва, 1977. - 53 с.
- Duca M. Aspecte genetice și fiziologice ale sistemului ASC-Rf la *Helianthus annuus* L.: Autoreferatul tezei de doctor habilitat în biologie. - Chișinău, 1998. - 40 p.

20. Christov M. Sources of cytoplasmic male sterility produced at IWS “Dobroudja” // *Biotechnol. & Biotechnol.* - 1993, - Vol.7. - No4. - P.132-135.
21. Thakur R.P., Rao V.P., King S.B. Ergot susceptibility in relation to cytoplasmic male sterility in pearl millet // *Phytopathology.* - 1989. - Vol.79. - P.1323-1326.
22. Hooker A.L., Smith D.R., Lim S.M., Musson M.D. Physiological races of *Helminthosporium maydis* and disease resistance // *Plant Dis. Repr.* - 1970. - Vol.54. - No12. - P.1109-1110.
23. Smith D.R., Hooker A.L., Lim S.M. Physiologic races of *Helminthosporium maydis* // *Plant Dis. Repr.* - 1970. - Vol.54. - P.19-822.
24. Duvick D.N. Potential usefulness of new cytoplasmic male sterile and sterility system. - In: *Proceedings of the 27th annual corn and sorghum research conference, 1972*, p.197-201.
25. Serieys H. Identification, study and utilization in breeding programs of new *cms* sources // *Helia.* - 1999. - No22. - P.71-84.
26. Tavaljanskiy N.P., Chepurnaya A.L., Scherstyuk S.V., Tikhomirov V.T. Development of sunflower sterile *CMS* analogues on the base of different cytoplasmic backgrounds // *Helia.* - 2004. - No40. - P.251-256.
27. Serieys H. Identification, study and utilization of breeding programs of new *CMS* sources. - In: *FAO Progress report of the working group. VII Consultation of European Cooperative Research Network on Sunflower, Pisa (Italy), 1991*, p.11-13.
28. Serieys H. Report on the past activities of the FAO working group: „Identification, study and utilization of breeding programs of new *CMS* sources” for the period 1991-1993 // *Helia.* - 1994. - Vol.17. - No21. - P.93-102.
29. R. Horn, R.H. Köhler, K. Zetsche. A mitochondrial 16-kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower // *Plant Molecular Biology.* - 1991. - Vol.7. - P.26-33.
30. Duca M., Port A., Orozco-Cardenas M.L., Lovatt C. Mecanisme moleculare ale androsterilității ereditare și induse la floarea-soarelui // *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei.* - 2006. - Nr.1. - P.86-93.
31. Sambrook J et al. *Molecular Cloning: A laboratory manual. Vol.1.* - Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.
32. Chenuil A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects // *Genetica.* - 2006. - No127. - P.101-120.
33. Indian Council for Agricultural Research, www.icar.delhi.nic.in
34. Henry R.J. *Plant Genotyping: the DNA fingerprinting of plants.* CAB International, 2001.

Prezentat la 18.07.2007