

POSSIBILITĂȚI DE AMELIORARE A LINIILOR DE INDUCERE A HAPLOIZILOR LA PORUMB

Mariana SARMANIUC

Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

Recently, rather high effective maternal-haploid inducers have been created. However, there is a need for their further improvement. New inducers should possess a higher frequency of haploid induction, improved agronomic traits and good expression of marker genes. The selection by plant traits and the expression of marker genes was carried out in a synthetic population created by the recombination of three haploid-inducer lines. 140 plants have been selected and self-pollinated. The frequency of haploid induction in the selected plants ranged from 0 up to 14%. For further improvement, was selected 8 plants, which demonstrated a higher frequencies of haploids than check - line MHI, a good expression of marker genes and agronomic traits.

Introducere

Porumbul este una dintre cele mai răspândite culturi cerealiere. În agricultura Republicii Moldova porumbul este utilizat atât în scopuri alimentare, cât și în calitate de cultură furajeră și materie primă industrială.

La cultivarea porumbului se utilizează pe larg efectul de heterozis – vigoarea hibridilor de primă generație. Această tehnologie prevede obținerea anuală de semințe hibride.

Crearea hibridilor de porumb este un proces destul de îndelungat. Numai pentru obținerea liniilor homozigote, care prezintă formele parentale ale hibridului, sunt necesari 5-7 ani.

Utilizarea noilor cercetări în genetică, elaborarea noilor tehnologii și metode de ameliorare pot duce la accelerarea procesului de creare a liniilor și hibridilor de porumb. Printre noile tehnologii și metode de ameliorare a porumbului un loc important ocupă tehnologia dublării numărului de cromozomi la plantele haploide, care reduce perioada de obținere a liniilor homozigote la 2 ani.

Utilizarea haploizilor la porumb a deschis noi posibilități pentru rezolvarea multor probleme ale geneticii și ameliorării. Plantele haploide sunt pe deplin apte de a supraviețui, formează boabe cu embrion normal diploid [1].

Prin termenul „haploid” se are în vedere plantele cu număr gametic sau redus de cromozomi ($n=10$). După clasificarea efectuată de Hohlov [2], haploizii sunt de trei tipuri:

1. Haplozi matroclini sau materni – se dezvoltă dintr-un ovul reduțional având nucleul și citoplasma gametului feminin.
2. Haplozii androgeni – se dezvoltă dintr-un ovul reduțional sau din altă celulă a sacului embrionar, în care cromozomii proprii sunt înlocuiți cu cromozomii aduși de spermă. Așa haplozii au nucleul unui gamet și citoplasma altui gamet.
3. Haplozii androclini sau paterni – se dezvoltă dintr-o celulă a gametofitului masculin. Ei au nucleul și citoplasma aceluiași gamet. Acești haplozii se obțin doar experimental, prin cultura de antere.

Primele plante haploide au fost depistate la *Datura stramonium* [3], mai târziu și la alte culturi: tomate, tutun, cartofi, soia, porumb, grâu, orez și altele [4]. Primii haploizi la porumb au fost obținuți spontan. Aceștia au fost haplozii materni. Frecvența lor a variat de la unul la o mie și de la unul la două mii de plante diploide [5,6].

Obținerea haploizilor a devenit posibilă datorită creării liniilor de inducere a haploizilor genetice efective. Prima linie de inducere a haploizilor, Stock 6, a fost depistată întâmplător în Statele Unite ale Americii [7]. Capacitatea acestei linii este de 2%, comparativ cu 0,1% – apariția pe cale naturală a haploizilor. Implicarea acestei linii în diferite încrucișări a dus la crearea de noi inductori cu un potențial de 2-3 ori mai înalt decât cel inițial. Una din astfel de linii este și linia MHI (Moldavian Haploid Inducer), creată în cadrul Institutului de Genetică din Moldova. Capacitatea de inducere a haploizilor a acestei linii este de 6-8% [8].

În cercetarea haploidiei, prezintă importanță deosebită apariția și evidențierea haploizilor. În acest scop, la nivel genetic în plantele inductor este introdus un anumit set de gene marcatore cu colorație antocianică. Aceste gene permit evidențierea haploizilor la diferite faze de dezvoltare la plantele F1, ca rezultat al încrucișării genotipurilor maternelor cu liniile de inducere a haploizilor.

Totuși, pe viitor este necesară ameliorarea în continuare a liniilor de inducere a haploizilor, această ameliorare fiind mult mai complexă – adică, paralel cu majorarea procentului de inducere a haploizilor, inductorii trebuie să aibă caractere agronomice maxime (înălțimea plantei, dimensiunea paniculei etc.), precum și prezența genelor marcher, care vor permite identificarea și selectarea mai eficientă a haploizilor.

Utilizarea inductorilor cu dimensiuni morfologice mari ale plantelor, ca formă paternă, poate ușura lucrul de ameliorare, polenizarea manuală fiind înlocuită cu polenizarea naturală – liberă. În așa caz, haplozii se vor putea obține de pe suprafețe mult mai mari. Astfel, se tinde ca noii inductori să aibă rezistență la secetă, polignire, boli și vătămători.

Scopul acestei lucrări constă în cercetarea materialului inițial, utilizat pentru crearea noilor inductori de inducere a haploizilor materni.

Material și metode

Pentru crearea materialului inițial au fost utilizate trei linii de inducere a haploizilor: Stock 6 [7], MHI (Moldavian Haploid Inducer) [8] și ZMS (Zarodışivii Marker Saratovskii) [9]. Fiecare din aceste linii servește ca sursă de anumite caractere, care prezintă interes pentru ameliorare:

1. Linia ZMS – prezintă interes pentru potențialul înalt al haploinducerii, până la 15%.
2. Linia MHI – posedă parametri maximali ai caracterelor cantitative, comparativ cu celelalte linii.
3. Linia Stock 6 – a fost selectată pentru prezența în sistemul marcher a genei *B-I*.

Genă *B-I* face parte din grupa genelor marcher antocianice, a cărei expresie manifestă colorarea organelor plantei în violet, atât la faza de plantule, cât și la faza de plante mature. Din aceeași grupă face parte și gena *Pl*, prezentă în sistemul marcher al liniilor MHI și ZMS. Totuși, între expresia acestor gene există diferență: expresia genei *B-I* manifestă colorație indiferent de radiația solară, ceea ce pentru gena *Pl* nu este caracteristic. Iar, ca alternativă în evidențierea haploizilor, expresia genei *B-I* manifestă și colorarea rădăcinilor la plantulele de 3-4 zile. Prezența genei *B-I* în sistemul marcher al noilor inductori prezintă criteriul primordial în evidențierea haploizilor, la faza de plante mature.

În anii precedenți liniile date au fost recombinat între ele după următoarea schemă:

- 1) (Stock 6 x ZMS) x MHI
- 2) (Stock 6 x MHI) x ZMS
- 3) (MHI x ZMS) x Stock 6.

Aceste combinații au fost semănate pe parcele separate, a câte 10 rânduri cu câte 20 plante fiecare, cu lungimea de 6 m.

Ajunsă la faza de înflorire, pentru autopolenizare au fost selectate plantele cu cea mai bună expresie a genei *B-I*, precum și cu caractere cantitative maxime (înălțimea plantelor, dimensiunile paniculei).

Pentru estimarea frecvenței haploizilor, plantele autopolenizate au fost încrucișate cu o populație sintetică SP [8]. Ca metodă de polenizare s-a utilizat polenizarea manuală. După recoltare, s-a determinat frecvența haploizilor pentru fiecare genotip aparte.

Rezultate și discuții

Din totalul de 460 plante, pentru autopolenizare au fost selectate 140 plante. În condiții de laborator, haploizii au fost selectați după expresia genei *RI-nj*. Fiind dominantă la toate trei linii de inducere, această genă manifestă colorarea în purpuriu a stratului aleuronic (endosperm), în formă de coroană purpurie, și în violet a embrionului la boabele hibride F1, obținute la încrucișarea inductorilor cu populația sintetică [10,11].

Expresia genei *RI-nj* servește ca marcher la evidențierea și selectarea haploizilor, la nivel de boabe mature. În descendența încrucișării genotipului patern (inductorii) cu genotipul matern (populația SP), în baza marcherului caracterizat mai sus, se obțin două tipuri de boabe:

- hibride – la aceste boabe, gena *RI-nj* manifestă atât colorarea endospermului, cât și colorarea embrionului, ca rezultat al fecundării duble, adică a nucleului central și a ovulului genotipului matern (populația SP) cu spermii ai formei paterne (inductor);
- haploide – la aceste boabe din cauza fecundării singulare, doar a nucleului central al genotipului matern cu inductorul, expresia genei *RI-nj* manifestă colorarea doar a stratului aleuronic (endospermului), fără colorarea embrionului.

Astfel, s-a determinat că frecvența haploizilor a variat până la 14%. Din totalul de genotipuri analizate, doar un anumit procent prezintă interes pentru cercetarea de mai departe. Pentru selectarea genotipurilor de interes a fost utilizată linia MHI, care posedă o frecvență a haploizilor de 6-8%. Astfel, din numărul total de genotipuri, în calitate de material inițial pentru ameliorarea de mai departe au fost selectate 8 genotipuri, care întrec frecvența martorului, linia MHI. Potențialul de inducere a acestor genotipuri a variat de la 9 la 14% (datele sunt indicate în Tabel).

Aceste genotipuri fac parte din diferite combinații. Numărul genotipurilor de interes depinde în mare măsură de raportul de germoplasmă a combinației din care face parte și care influențează în mod diferit frecvența haploizilor. În toate combinațiile, raportul de germoplasmă este de 50 : (25 : 25). Astfel, din combinația MHI x (Stock 6 x ZMS) și ZMS x (Stock 6 x MHI) fac parte majoritatea genotipurilor de interes, iar din combinația Stock 6 x (MHI x ZMS) face parte doar un singur genotip.

Tabel

Frecvența de inducere a haploizilor la genotipurile selectate comparativ cu martorul – linia de inducere MHI

Genotipul	Nr. total de boabe	Nr. boabelor haploide	Frecvența (%)	Combinății
Martor Linia MHI			6-8 %	
417-9	174	16	9,1	MHI x (Stock 6 x ZMS)
424-1	131	13	9,9	MHI x (Stock 6 x ZMS)
425-4	105	10	9,52	MHI x (Stock 6 x ZMS)
430-7	102	11	10,7	ZMS x (Stock 6 x MHI)
440-10	208	22	10,5	Stock 6 x (MHI x ZMS)
441-6	97	13	13,4	MHI x (Stock 6 x ZMS)
441-9	222	26	11,7	MHI x (Stock 6 x ZMS)
443-1	167	17	10,1	ZMS x (Stock 6 x MHI)

În materialul inițial supus cercetării și ameliorării au fost identificate genotipuri cu potențial al haploinducerii mai înalt decât martorul, precum și cu caractere cantitative și calitative favorabile ameliorării.

Astfel, rezultatele obținute demonstrează că crearea materialului inițial în baza recombinării diferiților inductori determină posibilitatea obținerii noilor linii de inducere a haploizilor materni.

Referințe:

1. Chalyk S.T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding // Euphytica. - 1994. - P.13-56.
2. Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е.В. и др. Гаплоидия и селекция. - Москва, 1976.
3. Belling J., Blakeslee A.F. The distribution of chromosomes in tetraploid *Daturas* S. // Amer. Nat. - 1924. - Vol.58. - P.60-70.
4. Kasha K.J., Seguin- Shwartz G. Haploidz in crop improvement. - In: M.Swaminathan, P.Gupta, U.Sinha (Eds). Cytogenetics of crop plants. - New Delhi, 1983, p.591.
5. Randolph L.F. Note of haploi frequencies // Maize Genetics Cooperation Newsletter. - 1938. - Vol.12. - P.12.
6. Randolph L.F. Note of haploi frequencies // Maize Genetics Cooperation Newsletter. - 1940. - Vol.14. - P.23-24.
7. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // American Naturalist. - 1959. - Vol.93. - P.381-382.
8. Chalyk S.T. Creating new haploid-inducing lines of maize // Maize Genetics Cooperation Newsletter. - 1999. - Vol.79. P. - 53-54.
9. Zavalishina A.N. Tyrnov V.S. Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize // Dokl Akad. Nauk SSSR. - 1984. - No 276(3). - P.735-738.
10. Nanda D.K., Chase S.S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.) // Crop Sci. - 1966. - No6. - P.213-215.
11. Neuffer M.G., Coe E.H., Wessler S.R. Mutants of maize. - New York: CSHL Press, 1997.

Prezentat la 26.01.2009