

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

Cu titlu de manuscris:

C.Z.U.575: 632.938.1+635.64

SARMANIUC MARIANA

**EFICIENTIZAREA TEHNOLOGIEI DE CREARE A LINIILOR
HOMOZIGOTE DE PORUMB (*ZEA MAYS L.*)**

162.01. Genetică vegetală

**Autoreferatul
tezei de doctor în științe biologice**

Chișinău, 2015

Teza a fost elaborată în laboratoarele *Genetică aplicată* și *Genetica rezistenței plantelor* ale Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei

Conducător științific:

LUPAȘCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

Referenți oficiali:

1. **ROTARI Alexandru**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător
2. **ANDRONIC Larisa**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Componența consiliului științific specializat:

1. **MICU Vasile**, *președinte*, academician, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
2. **COTENCO Eugenia**, *secretar științific*, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător
3. **PALII Andrei**, membru corespondent, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
4. **CRAVCENCO Anatolie**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar
5. **PARTAS Eugenia**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Susținerea va avea loc la “ **25** ” **Septembrie 2015**, ora **10⁰⁰** în ședința Consiliului Științific Specializat D 10 162.01 - 02 din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, MD-2002, str. Pădurii, 20, Chișinău, tel: (0373 22) 660424, fax: (0373 22) 556180

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM și la pagina web a CNAA (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la “ **13** ” **August 2015**

Secretar științific al Consiliului științific specializat,
Cotenco Eugenia, doctor în științe biologice,
conferențiar cercetător

semnătura

Conducător,
Lupașcu Galina, doctor habilitat în științe biologice,
profesor cercetător

semnătura

Autor,
Sarmaniuc Mariana

semnătura

(©Sarmaniuc Mariana, 2015)

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRILOR

Actualitatea temei. În ultimii 50 ani, creșterea productivității porumbului este determinată la nivel de 45-55% de implementarea noilor hibrizi [1] ce manifestă înalte capacități de producție și rezistență la factori nefavorabili de mediu [3]. Tradițional, hibridii sunt creați prin încrucișarea liniilor consangvinizate, homozigote care la rândul lor se obțin la autopolenizarea plantelor selectate timp de 6-10 generații [25].

Una din noile metodologii de producere a liniilor homozigote de porumb, reprezintă tehnologia liniilor *dublu haploide* (DH) [30, 32]. Producerea liniilor DH din germoplasma heterozigotă este un proces ce implică 2 generații: 1 – haploidă, indusă din plantele diploide (garnitura de cromozomi a acestora fiind redusă la jumătate); 2 – diploidă, obținută prin dublarea setului haploid de cromozomi, fiecare cromozom obținând astfel o copie identică. Planta diploidă rezultată, numită *dublu haploidă* este homozigotă la nivel de 100%, deoarece în fiecare pereche de cromozomi, unul este copia identică a celuilalt. Prin urmare, homozigoția completă este produsă în 2 sezoane de vegetație, spre deosebire de metoda tradițională care necesită autopolenizări recurente pe o durată îndelungată de timp [13, 23, 30].

Descrierea situației în domeniu și identificarea problemelor de cercetare. Obținerea haploizilor a devenit posibilă datorită creării liniilor cu capacitate specifică de inducere *in vivo* a dezvoltării embrionilor haploizi în rezultatul încrucișării cu plantă diploidă (normală). Numărul de haploizi din descendența totală de boabe reprezintă „*rata de inducere a haploizilor*” de către inductorul utilizat [23, 30]. Abilitatea inductorilor pentru haploidie *in vivo* la porumb prezintă un caracter care răspunde la selecție și, totodată, oferă largi oportunități la crearea noilor linii în ultimele trei decenii. Un aspect esențial al tehnologiei DH la crearea liniilor homozigote, constituie sistemul de diferențiere a boabelor sau plantulelor haploide [23]. În scopul facilitării capacității de identificare a boabelor haploide, în inductori au fost integrate gene dominante ce reglează sinteza antocianului în țesuturile embrionare și endospermale, plantă integră la diferite faze de dezvoltare [17, 24, 27, 29]. Pentru eficientizarea și accelerarea obținerii liniilor homozigote prin tehnologia DH, sunt necesare metode ce ar permite: 1) consolidarea sistemului de gene marker al inductorilor care să permită evidențierea exactă a haploizilor la diferite faze de dezvoltare din diverse tipuri de germoplasmă, fără eforturi și cheltuieli financiare semnificative; 2) ameliorarea caracterelor cantitative și calitative ale liniilor inductoare de haploidie; 3) restabilirea fertilității masculine la un număr cât mai mare de plante; 4) diminuarea acțiunii reprimante a agentului de dublare a numărului de cromozomi asupra viabilității plantei; 5) reducerea cheltuielilor pentru obținerea liniilor DH.

În legătură cu cele menționate, **scopul lucrării** a constat în eficientizarea tehnologiei de creare a liniilor homozigote prin explorarea fenomenului de inducere a haploizilor materni la porumb (*Zea mays* L.).

Obiectivele tezei:

- majorarea ratei de inducere a haploizilor;
- consolidarea sistemului de gene marker, pentru eficientizarea procesului de identificare a haploizilor la diferite faze de dezvoltare din varietăți diverse de porumb;
- ameliorarea caracterelor cantitative la inductorii de haploidie (înălțimea plantei, lungimea paniculului, durata înfloririi paniculului, cantitatea de polen, rezistența la cădere, boli și vătămători) ce influențează semnificativ numărul de încrucișări;
- elucidarea mecanismelor de inducere a haploizilor;
- optimizarea tehnicii de dublare a numărului de cromozomi la plantele haploide prin utilizarea inhibitorului mitotic – colchicina.

Metodologia cercetării științifice. Cercetările în domeniul investigat au inclus: selectarea materialului inițial pentru crearea liniilor inductoare de haploizi, hibridări, autopolenizări, selectări individuale [13]; elaborarea conceptului pentru crearea sistemului de gene marker în scopul identificării exacte a haploizilor [12, 17, 18]; observații fenologice, măsurări biometrice; optimizarea procedurii de dublare a numărului de cromozomi [2, 21]; analize statistice ale datelor obținute [28, 36] în pachetul de soft STATISTICA 7.

Noutatea științifică a rezultatelor. Pentru prima dată s-au creat linii cu rată de inducere a haploizilor de 10-15% care dețin un sistem eficient de gene marker al antocianului (*RI-nj*, *BI*, *PII*), expresia cărora permite identificarea exactă a haploizilor la diferite faze de dezvoltare a genotipurilor de porumb, iar caracterele cantitative ameliorate ale liniilor favorizează efectuarea unui număr mare de încrucișări.

Importanța teoretică a lucrării. Rezultatele obținute referitor la analiza heterofertilizării, capacității gametofitului masculin de a induce dezvoltarea diferitelor variante de boabe, influența perioadei de polenizare a știuleților contribuie la explicarea mecanismului de formare a haploizilor prin utilizarea liniilor inductoare de haploidie la porumb.

Problema științifică soluționată constă în *fundamentarea științifică* a conceptului de eficientizare a tehnologiei de creare a liniilor dublu haploide în *vederea explorării dirijate* a sistemului de gene marker al sintezei antocianului, sporirii performanței caracterelor cantitative și optimizării procedurii de dublare a numărului de cromozomi, *fapt care a contribuit* la

majorarea randamentului de obținere a genotipurilor haploide și reducerea termenului de creare a liniilor homozigote de porumb.

Valoarea aplicativă. Liniile LHI pot fi utilizate în procesul de obținere a haploizilor materni din diferite genotipuri de interes genetic și ameliorativ. Pentru restabilirea fertilității, a fost optimizat procedeul de dublare a cromozomilor la plantulele haploide cu colchicină direct în condiții de câmp.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

- capacitatea de inducere a haploizilor de către inductorii creați în baza liniilor inductoare Stock 6, ZMS, MHI;
- controlul genetic al capacității de inducere a haploizilor de porumb;
- consolidarea sistemului genetic de gene marker al antocianului la porumb;
- crearea liniilor DH/homozigote de porumb prin implicarea inhibitorului mitotic (colchicina).

Implementarea rezultatelor științifice: liniile inductoare de haploizi materni se utilizează în programele de ameliorare ale Institutului de Fitotehnie “Porumbeni” și IGFPP al AȘM.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele investigațiilor au fost prezentate la ședințele Consiliului Științific al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM (2008, 2009, 2010); Conferința națională cu participare internațională: "Probleme actuale ale Geneticii, Fiziologiei și Ameliorării Plantelor" (Chișinău, 2008); Congresul al IX-lea Internațional al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova" (Chișinău, 2010); Conferința „Genetica și fiziologia rezistenței plantelor” (Chișinău, 21 iunie, 2011); Simpozionul Științific Internațional (100 ani de la nașterea distinsului savant și om de stat Mihail Sidorov) (Chișinău, 2014); Congresul al X-lea Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău, 28 iunie – 1 iulie 2015.

Cercetările prezentate în lucrare au fost realizate în cadrul proiectului pentru tinerii savanți „Elaborarea metodelor eficiente de dublare a numărului de cromozomi la plantele haploide de porumb” 09.819.04.04A (2009–2010) (AȘM, Republica Moldova) și proiectului instituțional „Elaborarea tehnologiilor genetice de creare a soiurilor și hibridilor valoroși de culturi agricole, cu potențial ereditar înalt pentru caracterele de producție, calitate și rezistență” 11.817.04.10A (2011–2014).

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetărilor sunt prezentate în 9 lucrări științifice (5 fără coautori), inclusiv 3 – în reviste recenzate naționale, 1 – revistă internațională, 1 – în

culegeri științifice naționale, 1 – în culegeri științifice internaționale, 3 – teze la conferințe/congrese naționale cu participare internațională.

Volumul și structura tezei. Teza este redactată pe 136 pagini (112 – text de bază) și constă din adnotări, introducere și 3 capitole, dintre capitolul 1 prezintă analiza situației în domeniul tezei, 2 – materialul și metodele de cercetare, 3 – partea experimentală a tezei care include datele obținute și discuția acestora; concluzii generale și recomandări; bibliografie; anexă.

Cuvinte-cheie: porumb, tehnologii, inductori, haploizi, gene marker antocianice, dublarea numărului de cromozomi, linii dublu haploide, linii homozigote.

CONȚINUTUL TEZEI

1. FENOMENUL DE HAPLOIDIE – EXPLORAREA ÎN GENETICA ȘI AMELIORAREA CULTURILOR AGRICOLE

Compartimentul prezintă o sinteză a datelor acumulate din literatura de specialitate privind istoricul și clasificarea haploizilor; metodele de inducere a haploizilor; procedeele de majorare a frecvenței haploizilor; apariția și crearea noilor linii cu capacitate de inducere a haploizilor, aspectele genetice ale fenomenului de inducere a haploizilor, metodele de dublare a cromozomilor la haploizi, domeniile de utilizare a plantelor haploide și dublu haploide; rolul tehnologiilor DH la crearea liniilor homozigote de porumb.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările s-au efectuat în cadrul laboratoarelor *Genetică aplicată* și *Genetica rezistenței plantelor* ale Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM pe parcursul anilor 2008-2014, în condiții de câmp și de laborator. În calitate de material inițial pentru cercetare au servit populațiile hibride create prin încrucișarea a trei linii inductoare de haploizi la porumb – Stock 6, ZMS și MHI. Între inductorii inițiali, timp de două sezoane s-au efectuat hibridări după următoarea schemă: anul I: Stock 6 x ZMS, Stock 6 x MHI, MHI x ZMS; anul II: (Stock 6 x ZMS) x MHI, (Stock 6 x MHI) x ZMS, (MHI x ZMS) x Stock 6. Ca rezultat s-au creat trei combinații hibride cu raportul de germoplasmă 50×(25×25). Aprecierea capacității de inducere a haploizilor s-a efectuat prin implicarea inductorilor de diferite generații în încrucișări cu donorii (forme maternelle din care s-au obținut haploizii). În cazul familiilor F₃ și F₄, rata de inducere a haploizilor s-a determinat pentru fiecare plantă inductor cu caractere valoroase în mod individual prin încrucișări *plantă donator x plantă inductor*. Determinarea capacității inductoare a liniilor F₅ și F₆ s-a realizat la nivel de familie. Totalitatea plantelor cu caractere calitative și

cantitative valoroase atestate într-un singur rând au format o familie, iar încrucișările s-au realizat la nivel de *plantă donor x familie inductor*. În scopul vizat, în calitate de donori s-au utilizat populațiile sintetice SPC₄, SAC₃, SPC₄ x SAC₃, diferiți hibrizi – Debiut și hibrizi oferiți cu amabilitate de cercetătorii Institutului de Fitotehnie „Porumbeni”. Frecvența haploizilor s-a determinat la faza de boabe uscate în baza expresiei genei marker *RI-nj*. În descendența F₆ s-a analizat expresia genelor *BI* și *PII* la plantule de 3-4 zile, obținute ca rezultat al încrucișării donurilor cu diferiți inductori. Pentru aceasta, cariopsele au germinat în termostat la temperatura de 26°C până la apariția sistemului radicular. Plantulele hibride ce au moștenit markerii de la polenizator, posedă sistem radicular pigmentat, spre deosebire de haploizii dezvoltați din ovule nefecundate, fără pigmentarea acestuia. Gradul de intensitate a pigmentării antocianice a embrionului și endospermului controlată de gena marker *RI-nj* s-a stabilit în scara de 5 trepte: 4 – puternic, 3 – mediu, 2 – slab, 1 – foarte slab, 0 – lipsa pigmentației.

Pentru obținerea liniilor DH de porumb, s-a optimizat procedeul de dublare a numărului de cromozomi cu colchicină la plantele haploide. Ca material s-au utilizat plantule haploide de 3-4 zile n(MK109), n(Rf7 x Ky123) obținute prin încrucișarea donurilor MK109 și Rf7 x Ky123 cu liniile inductoare de haploizi. Administrarea colchicinei în concentrațiile 0,03; 0,06 și 0,12% s-a realizat la nivelul zonei de creștere a plantulelor de 3-4 zile, durata de tratare constituind 12 și 24 ore. **În condiții de câmp** s-au aplicat diferite procedee: „*găurire*” – penetrarea plantulei cu un fir de ață la nivelul zonei de creștere; „*tivitură*” – tivirea zonei de creștere – în ambele cazuri capetele aței cu lungimea de 4-5 cm fiind introduse în eprubetă cu soluție de colchicină; „*absorbție*” – similar primului procedeu, diferența constând în păstrarea integrității zonei de creștere a plantulei. **În condiții de laborator** boabele au fost germinate, iar la coleoptilul de circa 4 cm s-a înlăturat partea superioară, plantulele fiind introduse în soluție de colchicină de 0,06% + DMSO de 0,5% pentru 12 ore, după care au fost plantate în câmp [21]. Eficacitatea metodelor de dublare a numărului de cromozomi s-a determinat conform numărului de plante cu panicul fertil care după autopolenizare formează boabe.

Ca bază a oricărei metode genético-biometrice de studiu servește modelul matematic, în care sunt simplificate supozițiile despre influența factorilor ereditari și de mediu, interacțiunilor acestora asupra caracterului cercetat, dar și posibilelor efecte ale acțiunii cercetătorului asupra factorilor menționați [28]. Datele obținute au fost prelucrate statistic în baza analizelor varianței (\bar{x} – media aritmetică; m_x – eroarea medie; S_{mx} , – eroarea totală (%), σ – deviația standard; V – coeficientul de variație (%). Autenticitatea deosebirilor s-a stabilit în baza testului t, la nivelul de probabilitate $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$. S-au efectuat, de asemenea, analiza bifactorială a

varianței [15]; analize clusteriene prin construirea dendrogramelor de distribuție – metodă ierarhică și prin metoda *k-mediilor* – metodă centroidă, frecvent aplicate în cercetările biologice [11, 31, 36]; analiza corelațională a factorilor (gradul și orientarea dependenței) și regresională (ecuația matematică a dependenței). În scopul elucidării particularităților de repartiție a plantelor în clase fenotipice au fost utilizate **histogramele** - *frecvențele de distribuție*, un avantaj incontestabil al cărora constă în oportunitățile de stabilire ușoară a tendințelor de schimbare a parametrului cercetat, centrului, diapazonului/variabilității și formei de distribuție a valorilor [14]. Frecvența haploizilor (%) s-a calculat conform formulei: $[\text{num.boabelor haploide} / \text{num.total boabe}] \times 100\%$. Analiza statistică a datelor obținute s-a efectuat în pachetul de soft STATISTICA 7.

3. INDUCEREA HAPLOIDIEI *IN VIVO* – EFICIENȚA NOILOR LINII INDUCTOARE ȘI CREAREA LINIILOR HOMOZIGOTE DE PORUMB (*Zea mays* L.)

3.1. Tehnologia de creare a liniilor inductoare de haploizi materni

În scopul creării noilor inductori eficienți, s-au utilizat trei combinații obținute prin hibridarea liniilor Stock 6, ZMS și MHI. Pentru aceasta s-a propus ameliorarea: 1) capacității de inducere a haploizilor; 2) caracterelor calitative – manifestarea fenotipică a genelor marker; 3) caracterelor cantitative – înălțimea plantei, lungimea paniculului, durata înfloririi, cantitatea de polen, rezistența la cădere.

Îmbunătățirea capacității de inducere a haploizilor. Pornind de la descendența F_2 în combinațiile hibride s-au efectuat selectări individuale și autopolenizări ale formelor cu expresie pronunțată a genelor marker ale antocianului, valori maxime ale parametrilor morfologici și cu eficiență de inducere înaltă (minimum 9%) a haploizilor. Genotipurile haploide s-au selectat în baza manifestării fenotipice a genei marker *RI-nj* [24, 29] ce determină pigmentarea antocianului în stratul aleuronic și scutelum la faza de coacere tehnică a boabelor. Ca rezultat al încrucișării donorului cu inductorul, conform expresiei genei *RI-nj*, boabele s-au diferențiat în:

- hibride – ca rezultat al fecundării duble - nucleului central și ovulului, se dezvoltă boabe cu endosperm triploid și embrion diploid, gena *RI-nj* determinând pigmentarea stratului aleuronic și a scutelumului,
- haploide – în urma fecundării doar a nucleului central și dezvoltării endospermului triploid, gena *RI-nj* determină pigmentarea stratului aleuronic, în timp ce embrionul haploid matern rămâne nepigmentat.

- maternelle – ca consecință a contaminării cu polen propriu, se obțin boabe fără pigmentația endospermului și embrionului.

Descendența F₃ (a.2008). Din 458 plante, 80 au fost selectate pentru autopolenizare și implicate în încrucișări cu donatorul – populația sintetică SPC₄. Frecvența haploizilor a înregistrat valori în limitele 1 - 13,4%, genitorul MHI demonstrând un randament de 6,3%. Din totalul de plante autopolenizate, 8 descendenți: F₃ 17, F₃ 24, F₃ 25, F₃ 30, F₃ 40, F₃ 41(1), F₃ 41(2), F₃ 43 în încrucișările cu donatorul au demonstrat o capacitate înaltă de inducere a plantelor haploide, rata acestora fiind 9,1-13,4%.

Frecvența de inducere a haploizilor manifestată de formele selectate a depins în mare măsură de raportul de germoplasmă al combinației hibride din care fac parte. După cum s-a menționat, comparativ cu alte 2 linii inițiale – Stock 6 și ZMS, linia MHI posedă cea mai înaltă capacitate de inducere a haploizilor. Liniile F₃ 17, F₃ 24, F₃ 25, F₃ 30, F₃ 40 F₃ 41(1), F₃ 41(2) au provenit din combinația MHI × (Stock 6 × ZMS), iar F₃ 43 – din combinația ZMS × (Stock 6 × MHI). Din combinația Stock 6 × (MHI × ZMS) nu s-a selectat nici o formă cu caractere calitative și cantitative valoroase [6].

Descendența F₄ (a.2009). Din 470 plante analizate, pentru autopolenizare s-au selectat 174, ulterior implicate în încrucișări cu populația sintetică SPC₄×SAC₃. Frecvența haploizilor a înregistrat valori cuprinse în intervalul 1-14,8%. MHI a prezentat un randament de inducere de 6,5%. Ca rezultat, au fost identificate 11 forme din combinația MHI×(Stock 6×ZMS) – F₄ 7, F₄ 8, F₄ 9-1, F₄ 9-2, F₄ 9-3, F₄ 40-1, F₄ 40-2, F₄ 42-1, F₄ 42-2, F₄ 44-1, F₄ 44-2 ce au indus haploizi în populația SPC₄×SAC₃ cu frecvență de 9,2-14,8%, media lotului constituind 11,2%.

Descendența F₅ (a.2010). Au fost selectate pentru autopolenizare 21 familii din 45 analizate, și implicate în încrucișări cu populațiile sintetice SPC₄×SAC₃, SAC₃ și hibridul MK109×Ky123. În combinație cu populația SPC₄×SAC₃, 12 familii F₅ au manifestat o capacitate de inducere înaltă: 9,5-13,5, în timp ce MHI a indicat o rată de 6,8% [6, 30]. Cu excepția formei F₅ 43, toate celelalte au prezentat diferențe cu suport statistic ($p \leq 0,05$) în raport cu martorul. Astfel, familiile F₅ 19; F₅ 20 și F₅ 36 cu capacitate de inducere a haploizilor de 13,0; 12,2 și 12,4%, respectiv, au demonstrat o eficiență mult mai înaltă, comparativ cu MHI. Familiile F₅ 21 și F₅ 39, la obținerea boabelor haploide din populația SPC₄×SAC₃ au prezentat un randament de 13,5 și 13,0%, respectiv. S-au identificat 6 familii de inductori ce au demonstrat o capacitate de inducere înaltă: 9,1-11,2% în încrucișarea cu populația SAC₃ și care au depășit semnificativ ($p \leq 0,05$) inductorul MHI, cele mai performante fiind F₅ 38, F₅ 35, F₅ 20, cu un randament de 10,7; 10,8 și 11,2%, respectiv. Un alt donator utilizat la estimarea capacității de inducere a

haploidiei de către familiile F_5 a fost hibridul MK109×Ky123. Din totalul de familii analizate, doar F_5 21 și F_5 23 au prezentat un randament mai mare de 9%, aceste familii inducând haploizi cu rata de 10,2 și 10,3%, astfel demonstrându-se o eficiență mai pronunțată în raport cu MHI ($4,7\pm 0,4\%$). Deși capacitatea de inducere a haploizilor, în primul rând, depinde de genotipul utilizat ca polenizator, germoplasmă donorului poate influența randamentul de obținere a haploizilor [22, 27, 32], influența formei materne fiind constatată și pentru alte gene mutante la porumb [4]. Estimarea frecvenței haploizilor pe fundalul donatorilor $SPC_4\times SAC_3$, SAC_3 și MK109×Ky123 au confirmat acest lucru.

Testarea familiilor F_5 cu privire la inducerea haploizilor pe fundalul donatorilor $SPC_4\times SAC_3$, SAC_3 și MK109×Ky123 a demonstrat, că 3 dintre acestea – F_5 21, F_5 23 și F_5 20 (ultima testată doar pe primele 2 fondaluri) au manifestat o capacitate de inducere de 10,2-11,7%, mult mai avansată comparativ cu martorul MHI (5,53%). Familia F_5 21 în încrucișările cu populațiile $SPC_4\times SAC_3$, SAC_3 și hibridul MK109 x Ky123 a demonstrat o capacitate de inducere de 11,26%, iar F_5 23 – 10,2%, respectiv. De asemenea și familia F_5 20 a demonstrat eficiență înaltă în combinațiile cu populațiile $SPC_4\times SAC_3$ și SAC_3 – 10,2-11,7%, mult mai avansată comparativ cu martorul MHI (5,53%) (Figura 3.1).

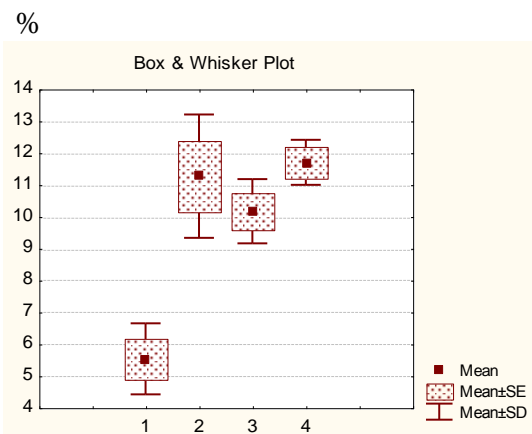


Fig. 3.1. Capacitatea familiilor F_5 de inducere a haploizilor la încrucișarea cu populațiile sintetice $SPC_4\times SAC_3$, SAC_3 și hibridul MK109×Ky123.

Pe orizontală: 1 – MHI (martor), 2 – F_5 21, 3 – F_5 23, 4 – F_5 20.

Deci, formele F_5 în raport cu cel mai bun genitor – MHI (5,5%), au manifestat o capacitate de inducere a haploizilor semnificativ majorată. Pe lângă aceasta, unele familii induc eficient haploizi, independent de fundalul genotipului donor, ceea ce are o mare importanță pentru durabilitatea și oportunitățile de utilizare a acestora în încrucișările cu un spectru larg de forme materne.

Descendența F₆ (a.2011). Pentru aprecierea formelor F₆ cu privire la eficiența de inducere a haploizilor, au fost analizate 53 familii, dintre care pentru autopolenizare s-au selectat 23. În calitate de donori s-au utilizat populația sintetică SPC₄×SAC₃ și hibridul Debiut.

În populația SPC₄×SAC₃, din totalul de familii selectate, 14 au manifestat o rată de inducere a haploizilor de 9,8-12,9%, în timp ce MHI a demonstrat un indice de 6,3%. Cele mai bune rezultate au demonstrat familiile F₆ 26; F₆ 27; F₆ 28; F₆ 32; F₆ 33; F₆ 37; F₆ 39; F₆ 63, cu o rată a haploizilor de 10,9-12,9%, unele din ele – F₆ 26; F₆ 28 și F₆ 32, manifestând capacitate de inducere de 2 ori mai mare, decât cel mai bun genitor MHI. Pe fondalul donoului – hibridului Debiut, 8 familii au manifestat o eficiență de inducere de 9,2-11,4%, ceea ce prezintă un avantaj evident în raport cu MHI (5,8%). Comparativ cu populația SPC₄×SAC₃, pe fundalul căreia s-au obținut haploizi cu frecvență maximă de 17,3%, la încrucișarea cu hibridul Debiut, cea mai înaltă rată a constituit 16%. Analiza comparativă a capacității medii de inducere a haploizilor, manifestată de familiile F₆ pe fundalul a 2 donori – populația SPC₄×SAC₃ și hibridul Debiut a pus în evidență că acestea au prezentat un randament de 9,6-12,8%, iar martorul – MHI: 6,1%.

De menționat că liniile testate au manifestat, totodată, o stabilitate relativă a capacității de inducere la încrucișarea cu acești donori, deviația standard (σ) variind în limitele 0,14-0,99. Excepție a prezentat doar F₅ 29 la care s-a atestat o variabilitate mai pronunțată: $\sigma=2,19$ (Figura 3.2).

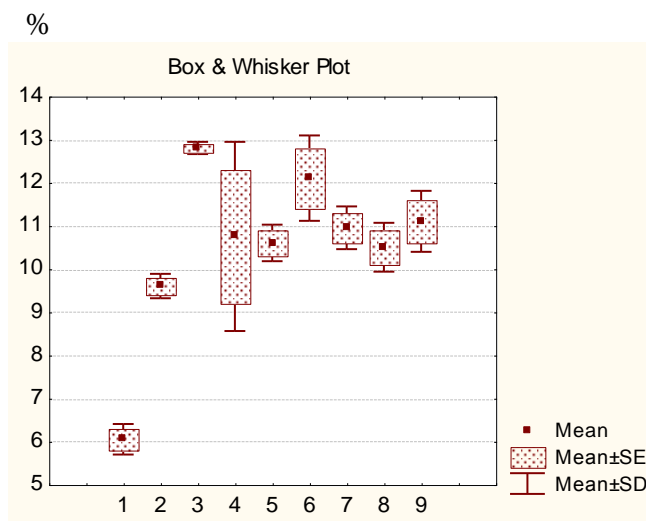


Fig. 3.2. Capacitatea familiilor F₆ de inducere a haploizilor la încrucișarea cu populația sintetică SPC₄×SAC₃ și hibridul Debiut.

Pe orizontală: 1 – MHI (martor), 2 – F₆ 19, 3 – F₆ 26, 4 – F₆ 29, 5 – F₆ 30, 6 – F₆ 32, 7 – F₆ 33, 8 – F₆ 36, 9 – F₆ 63.

Deci, prin selectarea individuală a plantelor, cu indici înalți ai caracterelor cantitative (înălțimea plantelor, lungimea paniculului, durata înfloririi paniculului, cantitatea de polen) și calitative (manifestarea fenotipică puternică a genelor marcatore ale antocianului) în generațiile F_4 ... F_6 , urmată de autopolenizare s-au obținut noi forme cu eficiență înaltă de inducere a haploizilor materni. Unele linii au depășit de 2 ori cel mai bun genitor – MHI, altele pe fundalul diferiților donori au indus haploizi cu rată mai înaltă de 9% [8].

Analiza variației genetice a capacității de inducere a haploizilor. Conform cercetărilor descendentei F_3 (2008), combinația hibridă Stock 6×(MHI×ZMS) s-a deosebit de MHI×(ZMS×Stock 6) și ZMS×(MHI×Stock 6) prin capacitate redusă de inducere a haploizilor și lipsă a variației genetice (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Variația genetică a capacității de inducere a haploizilor în diferite combinații hibride

Combi-nație hibridă	Rata haploizilor, %	σ generală	σ aleatorie	σ genetică	Testul F
F_3 Stock 6×(MHI×ZMS)	2,6 ± 0,4	1,4	1,4	-	-
F_3 MHI×(ZMS×Stock 6)	4,7 ± 0,6	2,9	1,7	2,4	3,1**
F_3 ZMS×(MHI×Stock6)	3,9 ± 0,9	2,9	1,4	2,5	4,0*

*, ** - semnificativ la nivelul $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$, respectiv.

Lipsa variației genetice în combinația Stock 6×(MHI×ZMS) relevă că genele ce controlează capacitatea liniilor MHI și ZMS de inducere a haploidiei au fost blocate de către genele liniei Stock 6. Plantele din prima combinație, pentru fiecare locus au genotipul SM, sau SZ. Lipsa variației genetice în prima combinație este determinată de faptul, că pentru fiecare locus $S_i M_i = S_i Z_i = S_i S_i$, alela S_i domină M_i și Z_i . Combinațiile MHI×(ZMS×Stock 6) și ZMS×(MHI×Stock 6) se deosebesc de prima, prin faptul că pe lângă genotipurile MS și ZS există și MZ, la care acțiunea alelelor M_i și Z_i nu este blocată de S_i . Tocmai aceste genotipuri determină capacitatea înaltă de inducere a haploizilor și variația genetică a acesteia. Semnificația variației genetice, determinată după criteriul Fisher indică de câte ori variația existentă între diferite plante din aceeași combinație depășește pe cea teoretic așteptată. După o autopolenizare, din cele trei combinații hibride în cercetare a rămas doar MHI×(ZMS×Stock 6). Descendența F_4 a prezentat o valoare medie a capacității de inducere de 4,4% și variație genetică de 1,7%. Descendența a inclus 25 de plante, un volum ce a permis construirea histogramei de repartiție a acestora în baza capacității de inducere a haploidiei (Figura 3.3 A). Distribuția s-a dovedit a fi

asimetrică, cu înclinare spre stânga față de mediană (coeficientul asimetriei: $1,27 \pm 0,46$, $p \leq 0,01$), ceea ce poate fi explicată prin acțiunea multipă a genelor, când efectele diferiților loci la combinarea într-un genotip nu se sumează, ci se înmulțesc. Această ipoteză, controlată prin transformare logaritmică, a demonstrat că coeficientul asimetriei a constituit $0,26 \pm 0,46$. Valoarea mediei fiind mai mică ca eroarea, demonstrează că asimetria dispare.

O altă explicație plauzibilă a repartizării asimetrice a formelor după capacitatea de inducere a haploizilor din combinația hibridă MHI×(ZMS×Stock 6) ar consta în faptul că fenomenul este cauzat de oligogene sau dominanța între loci. După trei autopolenizări în fiecare locus se așteaptă următoarele frecvențe genotipice (cu condiția, că acestea nu sunt distorsionate de selecție): MM – 14/32; ZZ – 7/32; SS – 7/32; MZ – 2/32; ZS – 2/32. Dintre liniile inițiale, MHI posedă cea mai înaltă capacitate de inducere, iar frecvența moștenirii genotipului MM constituie aproximativ 50%. Repartizarea formelor după frecvența genotipică la fel s-a dovedit a fi asimetrică, dar cu înclinație spre dreapta (Figura 3.3 B).

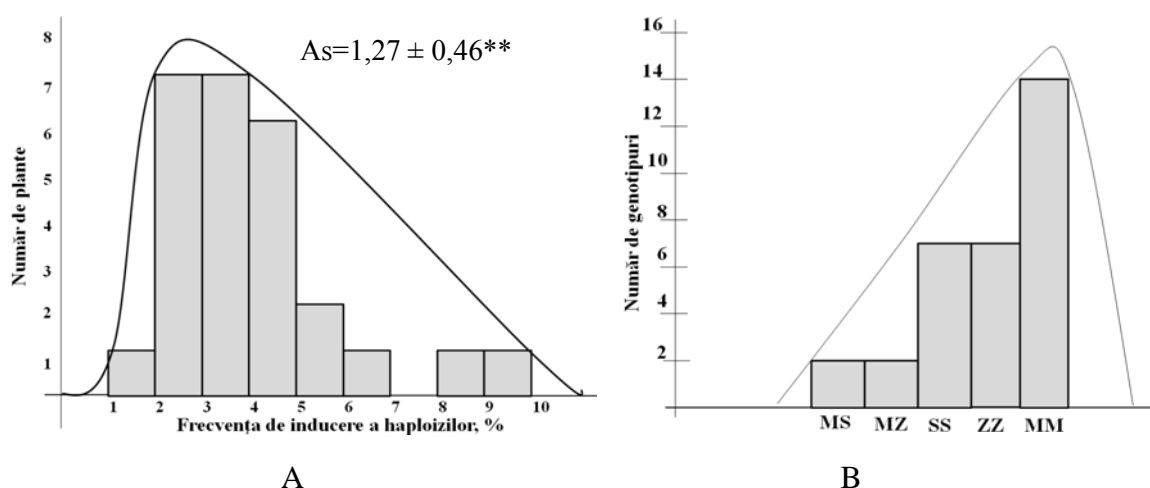


Fig. 3.3. Repartizarea formelor F₄ din combinația MHI×(ZMS×Stock 6) în baza capacității de inducere a haploizilor (A) și frecvenței genotipice (B).

În general, repartizarea asimetrică denotă faptul, că indicii progresului de selecție cu fiecare autopolenizare variază. La determinarea capacității de inducere s-au obținut următoarele valori ale mediei per descendență: F₄ – 4,4%; F₅ – 6,9%; F₆ – 7,7%. Deci, progresul general de selecție a constituit 1-2% per an. Analiza pedigrului a demonstrat, că inductorii F₆ cu capacitate înaltă de inducere a haploizilor provin din 3 plante F₄ și 4 familii F₅, respectiv.

Consolidarea sistemului genetic de identificare a haploizilor. O etapă importantă în procesul de creare a haploizilor materni *in vivo* prezintă identificarea boabelor cu embrion haploid în descendența F₁. Strategia de bază a cercetărilor noastre la aspectul vizat a constat în

consolidarea și eficientizarea sistemului de gene marcatore ale antocianului prin combinarea genelor *RI-nj* (*RI-Novajo*) cu *BI* (*Booster 1*) și *PII* (*Purple1*) în același sistem marker, deziderat care ar soluționa problema dificultății de identificare sau a excluderii nejustificate a boabelor haploide. Dintre genele antocianice, cea mai amplă utilizare la identificarea haploizilor se atestă pentru *RI-nj* [19, 20]. În combinație cu alte gene dominante ce controlează sinteza antocianului (*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C1* și *C2*), gena *RI-nj* determină pigmentație în aleuronă (țesut endospermal), cât și scutelum (țesut embrionar) în boabele uscate. Ca rezultat al polenizării donorului cu inductorul ce conține acest marker, haploizii dețin embrionul matern nepigmentat și endospermul triploid pigmentat derivat din genomul matern și patern.

Deși gena *RI-nj* este prezentă în toate trei linii inițiale, utilizate ca material inițial la crearea inductorilor, totuși extinderea și intensitatea pigmentului în fiecare din acestea este diferită, ceea ce este o dovadă a dependenței expresiei acesteia de fondalul genetic, adică a influenței interacțiunilor epistatice. Cea mai slabă pigmentație s-a constatat la linia Stock 6, iar cea mai accentuată – la ZMS. La polenizarea liniei A464 cu diferiți inductori s-a constatat, că markerul inductorilor F₆, spre deosebire de formele inițiale determină o pigmentație mai accentuată în boabele uscate, ceea ce relevă eficientizarea sistemului de gene marker antocianice.

În prezența markerilor *BI* și *PII*, sistemul radicular al diploizilor capătă colorație roșietică, iar planta matură – purpurie [20]. Pentru analiza expresiei acestor gene în sistemul radicular s-a încrucișat o formă maternă ce inhibă sinteza antocianului în endosperm și embrion cu un inductor F₆. S-a constatat că sistemul radicular la plantulele diploide manifestă colorație roșietică. Ca rezultat al dezvoltării endospermului triploid, diploizii au moștenit markerii inductorului, din care motiv în rădăcină s-a sintetizat antocianul. Plantulele haploide, provenite din ovule nefecundate nu conțin genele antocianului, iar sistemul radicular este nepigmentat, astfel genotipurile haploide fiind foarte ușor și exact deosebite de cele hibride. Aprecierea gradului de pigmentare antocianică în diferite organe ale plantei, determinată de expresia genelor *BI*, *PII* și *RI-nj* a demonstrat, că combinarea markerilor într-un sistem unic reprezintă un avantaj pentru noii inductori – markerii permit evidențierea cu succes a haploizilor la faza de boabe uscate în baza expresiei genei *RI-nj*, iar la faza de plantule și plante mature – conform genelor *BI* și *PII*.

Ameliorarea caracterelor cantitative la liniile cu capacitate de inducere a haploizilor.
Marea majoritate a liniilor cu capacitate de inducere a haploidiei se caracterizează prin talie mică a plantei, motiv pentru care nu pot fi utilizați în producerea haploizilor prin polenizare liberă, pe parcele izolate. Paralel cu îmbunătățirea capacității de inducere a haploizilor și consolidarea

sistemului de gene marker, s-a propus ameliorarea unor parametri cantitativi (înălțimea plantei, lungimea paniculului, capacitatea de producere a polenului, durata înfloririi paniculului), cât și rezistența la cădere. Inductorii din generațiile F_5 și F_6 au fost apreciați în testări comparative cu genitorii Stock 6, ZMS și MHI, ultimul având parametri cantitativi bine ameliorați.

Înălțimea plantei și lungimea paniculului. Plantele din familiile F_5 de interes, adică cu capacitate înaltă de inducere a haploizilor – F_5 19, F_5 20, F_5 21, F_5 23, F_5 25, F_5 26, F_5 29, F_5 33, F_5 34, F_5 35, F_5 36, F_5 38, F_5 39 și F_5 43 au înregistrat valori ale *înălțimii plantei* între 137,5 și 164,5 cm, și ale lungimii paniculului de 16,4-22,3 cm. Majoritatea liniilor au depășit inductorul martor – ZMS (125,5 cm), iar 4 familii – lina Stock 6 (144,5 cm). Linia MHI, cu înălțimea de 160,6 cm nu a fost depășită semnificativ de nici una din familiile menționate. În ce privește *lungimea paniculului*, s-a constatat practic acelaș tablou, cu unica excepție că linia Stock 6 (19,3 cm) a fost depășită de 3 familii. Rezultatele demonstrează, că plantele F_5 cu randament înalt de inducere s-au evidențiat și prin indici morfologici mai majorați decât genitorii ZMS și Stock 6 [6]. În descendența F_6 , 12 familii cu capacitate de inducere înaltă – F_6 26, F_6 27, F_6 28, F_6 29, F_6 30, F_6 32, F_6 33, F_6 36, F_6 37, F_6 38, F_6 39, F_6 63 au demonstrat indici ai *înălțimii plantei* de la 135,6 la 176,5 cm și *lungime a paniculului* de la 19,8 la 24,5 cm. În ce privește *înălțimea plantei*, o majorare semnificativă față de linia ZMS cu valoarea medie de 127,7 cm au demonstrat majoritatea familiilor. Excepție au făcut doar plantele din familia F_6 27, cu media de 135,6 cm. Comparativ cu Stock 6, indici mai înalți au demonstrat 6 familii – F_6 30, F_6 32, F_6 37, F_6 38, F_6 39, F_6 63, iar cu MHI (167,0 cm), ameliorare semnificativă a parametrului a demonstrat familia F_6 .39 care a înregistrat înălțimea medie de 176,5 cm. Referitor la *lungimea paniculului*, linia ZMS cu media de 14,3 cm, a fost depășită semnificativ de toate familiile F_6 cu capacitate de inducere înaltă. Comparativ cu Stock 6 – 20,5 cm, o majorare semnificativă de până la 23,4-24,5 cm au demonstrat familiile F_6 38, F_6 39, F_6 63. La nici una din familiile de interes nu s-a atestat o majorare semnificativă a lungimii paniculului în raport cu MHI. Coeficientul de variație a înălțimii plantei și lungimii paniculului la liniile F_6 , a variat între 1,2-3,9% și 3,6-11,1%, respectiv, ceea ce relevă variații nesemnificative pentru caracterele ameliorate, fenomen care posibil se datorează genotipului homozigot. Deși frecvența de inducere și expresia genelor marker au constituit principalele criterii de selecție, este important că unele dintre familiile F_6 s-au evidențiat și prin parametri morfologici mai avantajoși decât la cel mai bun genitor – MHI. Prin analiză corelațională (r) s-a constatat că dependența între înălțimea plantei și lungimea paniculului la inductorii de haploidie F_5 a constituit 0,77* ($p \leq 0,05$), iar la inductorii F_6 : 0,72* ($p \leq 0,05$). Rezultatele obținute demonstrează că plantele cu înălțime mai mare au și un panicul

mai lung. Ecuațiile regresionale ale dependenței sunt: $y = (-8,6528 + 0,1949) \times x$ (Figura 3.4 A) și $y = (3,5508 + 0,1182) \times x$ (Figura 3.4 B).

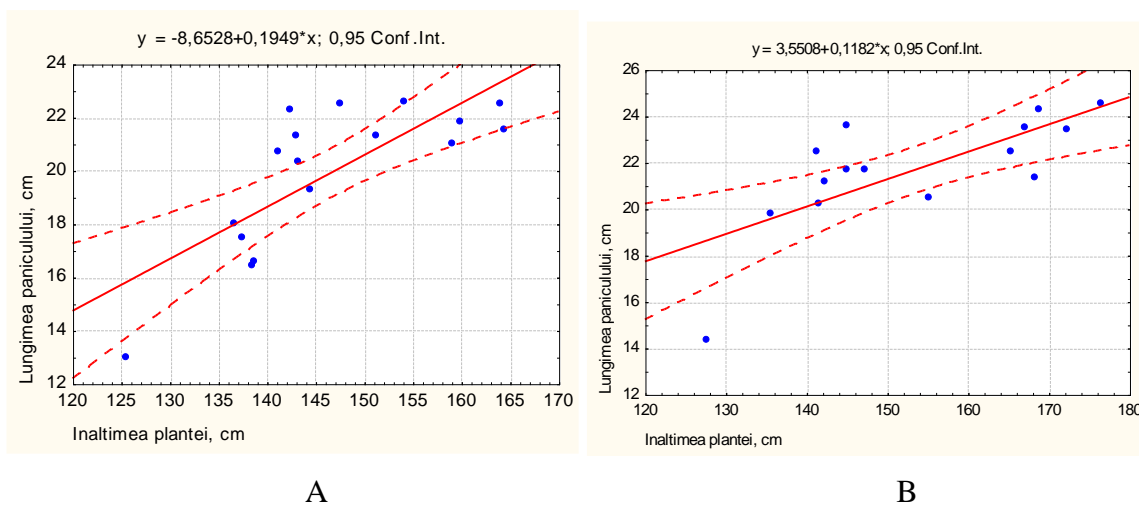


Figura 3.4. Dependența regresională între lungimea paniculului (y) și înălțimea plantei (x) la liniile inductoare de haploidie F₅ (A) și F₆ (B).

Astfel, în baza înălțimii plantelor poate fi calculată cu exactitate lungimea paniculului care prezintă un caracter ameliorativ important, întrucât există probabilitatea că asemenea paniculi să producă o cantitate mai mare de polen. De menționat că liniile de porumb F₆ 26 și F₆ 28 care s-au abătut de la tendința generală – intervalul de confidență, au înălțimea relativ mică, dar lungimea paniculului – mare.

Capacitatea de producere a polenului și durata înfloririi la liniile de porumb, inductoare de haploidie. Pentru liniile inductoare de haploidie dintre caracterele cantitative este importantă cantitatea de polen și durata înfloririi paniculului. În descendența F₆ plantele au produs zilnic o cantitate de polen de 0,188-0,318 g, pe durata de înflorire de 3-5 zile. Toate familiile ameliorate au produs mult mai mult polen decât MHI. Cele mai ameliorate familii – F₆ 27, F₆ 28, F₆ 32, F₆ 29, F₆ 33 au depășit cu mult nivelul liniei MHI (1,142 g), media caracterului variind în limitele 0,256-0,318 g. În ceea ce privește durata de înflorire, toate familiile de interes au demonstrat o perioadă de minimum 4 zile, iar la F₆.26, F₆.29, F₆.30, F₆.32, F₆.36, F₆.39, F₆.63 paniculul a produs polen timp de 5 zile. Media valorilor pentru înălțimea plantelor, lungimea paniculului, cantitatea de polen, durata înfloririi la aceste linii a variat în limitele: 165,5-176,5 cm; 21,3-24,5 cm; 0,188-0,234 g; 4-5 zile, respectiv [34].

Dendrograma de repartiție a liniilor F₆ (Figura 3.5), elaborată în baza caracterelor *înălțimea plantei, lungimea paniculului, cantitatea de polen, durata înfloririi paniculului*, a demonstrat că cea mai înaltă similitudine cu liniile ZMS (1), Stock (2) au manifestat liniile: 4 –

F₆ 26, 8 – F₆ 30, 9 – F₆ 32, 5 – F₆ 27, 6 – F₆ 28, 7 – F₆ 29, 10 – F₆ 33, iar cu MHI: 11 – F₆ 36, 12 – F₆ 37, 15 – F₆ 63, 13 – F₆ 38, 14 – F₆ 39, cu valori înalte ale indicilor incluși în studiu [35].

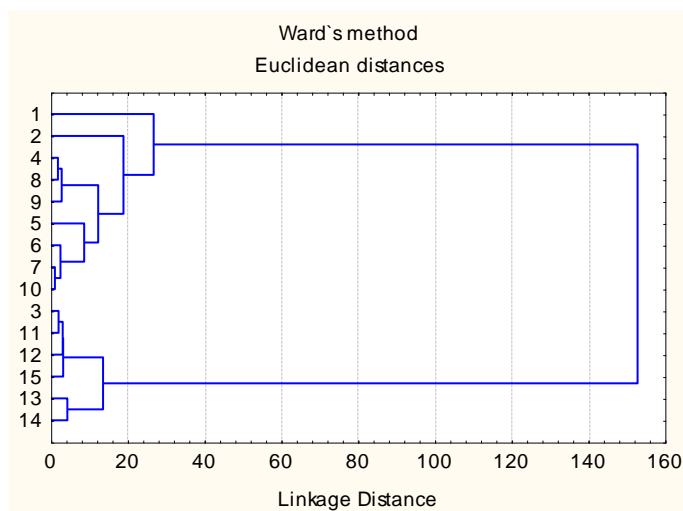


Figura 3.5. Analiza clusteriană a inductorilor creați în baza similitudinii unor caractere cantitative și morfobiologice.

1 – ZMS, 2 – Stock 6, 3 – Linia MHI, 4 – F₆ 26, 5 – F₆ 27, 6 – F₆ 28, 7 – F₆ 29, 8 – F₆ 30, 9 – F₆ 32, 10 – F₆ 33, 11 – F₆ 36, 12 – F₆ 37, 13 – F₆ 38, 14 – F₆ 39, 15 – F₆ 63.

Rezistența plantelor la cădere și sterilitatea masculină parțială. Inductorii de haploizi uneori demonstrează dezavantaje: unii sunt sensibili la cădere, alții dezvoltă paniculi cu sectoare sterile.

În cadrul familiilor F₆.26, F₆.27, F₆.28, frecvența plantelor sensibile la cădere a constituit 8-15%. Plantele din restul familiilor de inductori F₆ 26 s-au evidențiat prin rezistență sporită. După cum s-a menționat, familiile F₆ 26, F₆ 28 au prezentat indici favorabili ai înălțimii plantelor, lungimii paniculului și cantității de polen. Faptul că unele plante din cadrul acestor familii au fost predispuse la cădere, relevă că tendința de selectare a plantelor cu talie înaltă, urmează a fi realizată cu prudență pentru a nu selecta în paralel și genotipuri indezirabile.

Sterilitatea parțială a gametofitului masculin la unii inductori, precum e și firesc, influențează cantitatea și calitatea polenului, și desigur randamentul boabelor per știulete, acest fenomen atestându-se și la linia inițială MHI. Se cunoaște că aneuploidia poate cauza inducerea haploizilor [16]. Această mutație cromozomială determină diverse perturbări în timpul meiozei influențând, atât sterilitatea masculină parțială, cât și randamentul redus al boabelor pe știulete. Sterilitatea masculină parțială este ușor stabilită vizual: unele antere nu se deschid și nu produc polen. Primele depistări ale caracterului în generația F₆, a determinat excluderea din cercetare a

plantelor cu segmente sterile pe panicul. În cea mai mare parte, inductorii F_6 cu expresie reușită a genelor marker și capacitate de inducere înaltă au dezvoltat panicul cu polen totalmente fertil.

În general, utilizarea liniilor cu caractere cantitative ameliorate, ce produc polen în cantități considerabile și sunt rezistente la cădere sporesc semnificativ procesul de obținere a haploizilor materni, iar polenizarea manuală poate fi ușor înlocuită cu cea naturală, deschisă.

Liniile Haploid Inductoare (LHI) cu capacitate de inducere a haploizilor materni. La crearea noilor linii cu capacitate de inducere a haploizilor materni prin încrucișarea inductorilor ZMS, Stock 6 și MHI și selectarea individuală repetată a formelor valoroase în baza capacității de sinteză intensă a antocianului (genele *RI-nj*, *BI*, *PII*); parametrilor morfologici cu valori înalte; rezistenței la cădere; fertilității paniculului; ratei haploizilor de minimum 9 %, în a. 2011 din populațiile descendente F_6 s-a reușit selectarea a 11 linii numite *Linie Haploid Inductoare (LHI)*

Conform unor date din literatură, germoplasma maternă influențează frecvența dezvoltării boabelor haploide [22, 27] și manifestării fenotipice a genelor marker [20]. În cadrul proiectului de colaborare cu Institutul de Fitotehnie „Porumbeni” (2012-2017), liniile LHI au fost testate în încrucișările cu unii hibridi (în calitate de donori) creați la această instituție. Oportunitatea de a obține boabe cu embrion haploid dintr-un spectru larg de genotipuri a favorizat analiza detaliată a ratei de obținere a haploizilor și manifestării markerilor antocianici.

Sistemul marker al liniilor LHI conține genele menționate – *RI-nj*, *BI* și *PII*. Pigmentația embrionului și endospermului este o dovadă a garniturii diploide și triploide a cromozomilor, respectiv, astfel selectarea boabelor cu embrion haploid - fără colorație fiind ușoară. S-a constatat, că intensitatea pigmentării antocianice a endospermului și embrionului a variat la genotipurile cercetate între 0,9 și 3,9 în embrion și de la 0 la 3,7 în endosperm în scara de 5 trepte [2].

Analiza corelațională, a demonstrat că între gradul de pigmentare a endospermului și embrionului există o corelație înaltă: $r=0,87^*$ ($p\leq 0,05$), ceea ce relevă că gena *RI-nj* are, practic, aceeași expresie în genomul diploid (embrionul) și triploid (endospermul). Totodată, această corelație relevă oportunitatea de înlăturare exactă a boabelor diploide (Figura 3.6).

O altă etapă în aprecierea eficienței sistemului marker al liniilor LHI a constituit identificarea haploizilor pe fundalul diferiților donori la faza de boabe uscate (*RI-nj*), după care exactitatea selectării s-a determinat suplimentar la etapa de plantule de 3-4 zile (*BI*, *PII*) (Tabelul 3.2).

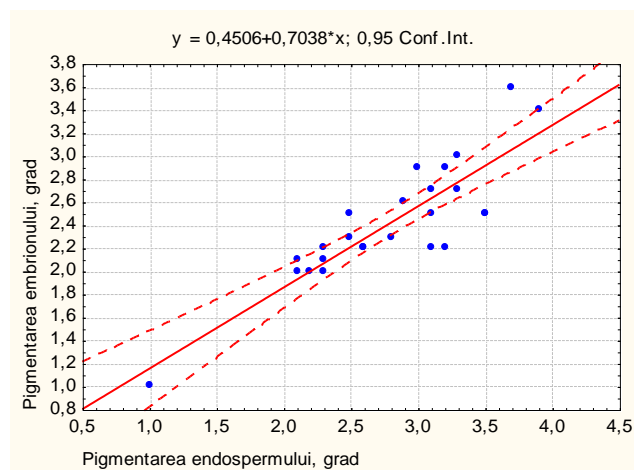


Fig. 3.6. Analiza regresională a dependenței colorației endospermului de colorația embrionului.

Tabelul 3.2. Eficiența selectării haploizilor din diferite genotipuri maternelor la faza de boabe uscate (*RI-nj*) și plantule de 3-4 zile (*B1* și *PII*)

Genotip	Numărul de boabe	Gradul de pigmentare		Nr. haploizilor conform expresiei genelor:	
		Embrion	Endosperm	<i>RI-nj</i>	<i>B1</i> și <i>PII</i>
Hibrid 2	94	3	3	9	9
Hibrid 3	62	4	4	6	6
Hibrid 5	113	2	3	11	13
Hibrid 6	14	3	3	3	3
Hibrid 7	157	4	4	9	9
Hibrid 9	51	3	4	3	4
Hibrid 10	72	1	2	2	10
Hibrid 12	63	0	1	4	8
Hibrid 13	65	3	3	5	6
Hibrid 14	68	3	4	6	8
Hibrid 15	123	2	3	4	8
Hibrid 19	50	3	3	5	7

Prin analiză corelațională, s-a constatat că între numărul haploizilor identificați în baza expresiei genelor *B1* și *PII* în plantule și expresia genei *RI-nj* în boabe uscate, gradul de corelație (r) este 0,65*. Astfel, la donorii cu manifestare puternică a genei *RI-nj* în endosperm și embrion, numărul de haploizi coincide cu cel estimat la faza de plantule, ca exemplu servind Hibridii 2, 3, 6, 7 și dimpotrivă, cu cât pigmentația din aleuronă și scutelum este mai slabă, cu atât haploizii la faza de boabe uscate sunt selectați inexact – Hibridii 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19. Deci, dacă gena *RI-nj* manifestă pigmentație intensă, haploizii pot fi selectați doar la faza de boabe uscate, iar în cazul pigmentației slabe a endospermului și embrionului, identificarea se va face suplimentar la faza de plantule de 3-4 zile [9].

Testarea inductorilor de generația 7 – LHI 2, LHI 3 și LHI 7, pe fundalul diferiților donori de tip *dentata* și *indurata* a demonstrat că frecvența haploizilor pe știuleții polenizați a variat între 1,41 și 21,1%, rata medie a acestora constituind 9,0-15,8%.

Autorii, Eder și Chalyk [22] au constatat că rata haploizilor pe fundalul porumbului sticlos, este mai redusă decât pe a celui dentat. Date similare s-au atestat și în cercetările prezentate. Astfel, inductorul LHI 2 în încrucișările cu categoria de donori „*porumb dentat*” a indus haploizi cu o rată medie de 9,0-11,1%, iar cu a doua, „*porumb sticlos*” – 6,8 %. LHI 3 a demonstrat media de 9,9-15,8% și 9,3%, iar LHI 7 – 10,0-14,8% și 5,8%, respectiv, celor doua grupuri de donori (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Rata medie a haploizilor induși de liniile LHI la diferite categorii de donori de porumb

Donor	Inductor	Numarul total de boabe	Nr. haploizilor	Rata medie a haploizilor, %	Variația ratei haploizilor, %
<i>Zea mays dentiformis</i>					
3	LHI 2	1025	105	10,3 ± 0,7	8,8 – 12,9
	LHI 3	816	90	11,1 ± 0,5	10,2 – 13,1
	LHI 7	810	98	12,1 ± 1,0	9,5 – 14,4
7	LHI 2	645	58	9,0 ± 1,2	5,3 – 13,9
	LHI 3	203	20	9,9 ± 2,3	6,3 – 12,8
	LHI 7	659	66	10,1 ± 1,3	4,1 – 13,9
11	LHI 2	1694	187	11,1 ± 1,1	7,1 – 16,9
	LHI 3	969	153	15,8 ± 1,8	11,6 – 21,1
	LHI 7	1327	184	13,9 ± 0,5	12,1 -16,1
15	LHI 2	1159	115	9,9 ± 1,0	4,2 – 17,2
	LHI 3	227	26	11,5 ± 4,1	7,9 – 19,4
	LHI 7	305	45	14,8 ± 1,9	10,4 – 19,4
<i>Z. mays indurata</i>					
5	LHI 2	455	31	6,8 ± 0,5	6,31 – 7,64
	LHI 3	803	75	9,3 ± 1,3	6,5 – 12,1
	LHI 7	482	28	5,8 ± 1,0	3,5 – 7,6

Astfel, s-a constatat că rata haploizilor induși de fiecare inductor în donorul *indurata* este aproximativ de două ori mai mică, decât în porumbul *dentata*.

Este cunoscut faptul că cea mai înaltă rată a haploizilor se obține în cazul polenizării știuleților la 2-3 zile de la apariția mătasei. Prin utilizarea inductorului LHI 7 s-a constatat că în raport cu ziua a 2-a, rata haploizilor a diminuat considerabil la ziua a 4-a, și în special, la ziua a 6-a de polenizare. În cazul polenizării știuleților la 4 zile de la înflorire, în unele genotipuri rata

haploizilor s-a redus aproximativ de 2 ori. După 6 zile de la apariția mătasei, indicele s-a redus de 3 ori, comparativ cu perioada de 2 zile. În ce privește donorul 11, rata haploizilor a diminuat ne semnificativ, chiar și la categoria știuleților polenizați la 6 zile de la apariția mătasei, ceea ce relevă performanța acestuia – posibilității de utilizare pe o durată mai mare de timp [10]. S-a stabilit că rata boabelor haploide este mai înaltă la vârful știuletelui decât la bază, însă în evoluția maturizării inflorescenței feminine, indicele descrește la ambele extremități. Astfel, la știuleții polenizați la 2 zile de la apariția mătasei, rata boabelor haploide a constituit 9,1 și 5,3%; la a 4-a zi, diferența, practic, fiind neschimbată, deși nivelul indicelui a diminuat: 7,29 și 3,29%, respectiv pentru prima și a doua variantă. La ziua 6, diferența între rata semințelor haploide formate la vârful (v) și la baza (b) știuletelui nu a avut suport statistic (Figura 3.7).

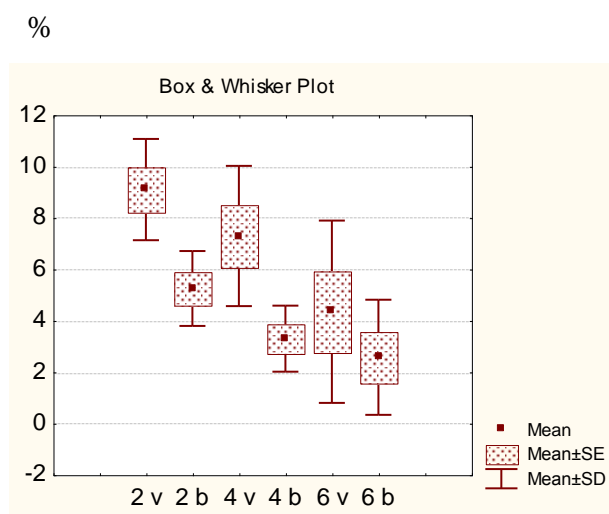


Fig. 3.7. Rata de formare a boabelor haploide la vârful (v) și baza (b) știuletelui, funcție de ziua polenizării: 2, 4, 6 zile.

Prin analiză corelațională s-a constatat lipsa dependenței între frecvența de formare a boabelor haploide la vârful și baza știuletelui, în cazul polenizării la 2 zile de la apariția mătasei, și, totodată, manifestarea corelațiilor înalte – pentru zilele 4 și 6: $r=0,88^*$; $r=0,97^*$ ($p \leq 0,05$), respectiv. Fenomenul ar putea fi explicat prin faptul că distribuția boabelor haploide, preponderent la extremitățile știuletelui, este controlată de 2 sisteme genetice independente, care își manifestă potențialul în condiții optime – 2 zile de la apariția mătasei.

În cazul variantelor 4 și 6 zile, putem presupune că manifestarea corelațiilor înalte ($0,88-0,97^*$) între frecvența de formare a boabelor haploide la cele 2 extremități este determinată nu atât de factorii genetici, cât de cei fiziologici: la zilele 4 și 6 prevalează procesele degenerative generale nespecifice gametofitului feminin, care inhibă în mare măsură manifestarea

componentei genetice, iar aparatul reproductiv feminin la etape mai târzii are, practic aceeași totipotență la extremitățile știuletelui.

3.2. Mecanisme ale fenomenului de inducere a haploizilor materni

S-a stabilit că polenizarea liberă a știuleților donatorului cu inductorii, comparativ cu cea artificială (manuală), a redus frecvența haploizilor, fiind influențată de heterofertilizare – participarea spermilor din diferite grăuncioare de polen la fecundarea dublă. Prin utilizarea a două linii - A464 și A619 în calitate de forme maternelle, a unui inductor și unei linii obișnuite – X28C (fără capacitate de inducere) în calitate de polenizatori, ambii deținători ai genei *R1-nj*, și prin aplicarea diferitelor tipuri de polenizări: polenizare simplă cu polen patern; polenizare cu amestec de polen (50 patern / 50 matern); autopolenizări repetate după 24, 48, 72 ore, s-au obținut 4 variante de boabe: 1) boabe maternelle fără pigmentație antocianică, 2) boabe cu pigmentație a endospermului și embrionului, 3) boabe cu pigmentație a endospermului, 4) boabe cu pigmentație a embrionului. Astfel, în baza pigmentării doar a endospermului sau embrionului ușor putem deduce că aceste boabe au rezultat din heterofertilizare care uneori au generat haploizi, confirmați ulterior la creșterea plantelor [33]. Fenomenul de heterofertilizare a fost mai evident la combinațiile în care ca polenizator s-a utilizat inductorul (Tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Frecvența și influența heterofertilizării asupra inducerii haploizilor la porumb

Polenizator	Forma maternă A 464		Forma maternă A 619	
	Haploizi, %	Heterofertilizare, %	Haploizi, %	Heterofertilizare, %
Inductor haploid	12,6	-	11,8	-
Linia X28C	-	-	-	-
Inductor (amestec de polen)	10,6	3,9	3,9	2,0
X28C (amestec de polen)	-	0,3	-	0,4
Inductor/autopolenizare 24 ore	5,2	1,5	6,0	1,3
X28C/ autopolenizare 24 ore	-	0,5	-	-
Inductor/ autopolenizare 48 ore	12,5	0,4	9,5	0,3
X28C/ autopolenizare 48 ore	-	0,2	-	-
Inductor/ autopolenizare 72 ore	10,0	0,7	8,5	0,4
X28C/ autopolenizare 72 ore	-	0,3	-	-

În polenizările cu amestec de polen (50/50) frecvența heterofertilizării la liniile A464 și A619 a constituit 3,9 și 2,0%, respectiv, iar la implicarea liniei X28C, frecvența heterofertilizării a prezentat 0,3 și 0,4%, respectiv. Utilizarea amestecului de polen a determinat și reducerea

frecvenței haploizilor. În cazul liniei A464, rata haploizilor s-a redus de la 12,6 la 10,6%, iar a liniei A619 – de la 11,8 la 3,9%.

Frecvența haploizilor și heterofertilizării s-a redus aproximativ de 2 ori în cazul polenizărilor repetate peste 24 ore, indicând valori de 5,2 și 1,5% la linia A464; 6 și 1,3% la A619, respectiv. Totuși, cea mai înaltă frecvență de heterofertilizare s-a detectat în cazul în care prima polenizare s-a efectuat cu polen prelevat de la inductor. Frecvența haploizilor poate varia și în cazul polenizărilor manuale. Polenizările mai târzii de la apariția mătasei duc la micșorarea frecvenței haploizilor, fenomen care la fel poate fi cauzat de heterofertilizare. Cel mai probabil, aceasta se datorează numărului mai mare de tuburi polinice ce penetrează sacul embrionar. Prin urmare, în cazul fertilizării singulare după polenizarea cu inductorul, probabilitatea compensării celulei spermatice lipsă cu un alt grăuncior de polen este mai mare. S-a constatat, că cea mai înaltă frecvență de haploizi se obține la polenizarea donorului după 2-3 zile de la apariția mătasei. Astfel, în unii saci embrionari are loc fecundarea dublă, în alții – singulară din care rezultă boabele haploide. În aceste condiții, se realizează o combinație reușită între numărul de haploizi și randamentul înalt al boabelor pe știulete.

Capacitatea gametofitului masculin de a induce dezvoltarea diferitelor variante de boabe.

La polenizarea donorului cu polenul inductorilor se obțin diferite variante de boabe: boabe hibride, rezultate din fecundarea dublă – a nucleului central și ovulului; boabe haploide – fecundarea doar a nucleului central, embrionul dezvoltându-se din ovulul haploid nefecundat; boabe fără endosperm – fecundarea doar a ovulului, nucleul central rămânând nefertilizat; boabe fără embrion – fecundarea celulei centrale din care se formează endospermul triploid, iar ovulul rămâne nefecundat. De asemenea, se pot dezvolta boabe cu endosperm redus și embrion viabil. Boabe fără embrion sau endosperm se dezvoltă și în rezultatul autopolenizării inductorilor. S-a constatat că frecvența boabelor haploide poate coincide cu frecvența celor fără endosperm sau embrion, dezvoltate în rezultatul autopolenizării inductorilor [33]. A fost stabilit că doar gametofitul masculin perturbază fecundarea dublă normală. La polenizarea inductorului cu linia obișnuită A464, s-au obținut boabe diploide normale cu un randament optim pe știulete. Aceasta demonstrează, că inflorescențele feminine (știuleții) nu posedă careva anomalii, din care motiv nu apar diferite variante de boabe. În baza rezultatelor analizei heterofertilizării și gametofitului masculin putem enunța ipoteza, că inducerea haploizilor materni este rezultatul fecundării singulare în care spermii fecundă doar celula centrală a sursei donor. Totuși, nu putem exclude faptul, că fenomenul inducerii haploizilor materni este unul complex, din care motiv există unele aspecte incerte.

3.3. Utilizarea diferitelor metode de dublare a numărului de cromozomi la crearea liniilor homozigote de porumb

În scopul optimizării metodei de dublare a numărului de cromozomi la haploizi cu colchicină în condiții de câmp, s-a recurs la diferite procedee – găurire, tivitură și acoperirea zonei de creștere. În testare au fost implicați haploizii n(MK109) și n(Rf7 x Ky123), crescuți până la faza de 3-4 frunze. S-a utilizat colchicină de 0,03; 0,06 și 0,12%, cu durată de tratare de 12 și 24 ore. Metoda de dublare a cromozomilor în condiții de laborator a servit ca martor. Testarea eficienței metodei s-a realizat în două sezoane consecutive (a.2009, 2010).

Dublarea numărului de cromozomi la haploizi prin procedeul „găurire”. Dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide n(MK109) la faza de 3 frunze cu colchicină de 0,06%, tratate timp de 12 ore a permis restabilirea fertilității masculine la 7,4% plante, iar în rezultatul autopolenizării 3,7% au dezvoltat boabe diploide. La tratarea plantulelor cu 4 frunzulițe s-au obținut 9,37% de plante fertile, dar nici una nu a format boabe. Administrarea reagentului de dublare timp de 24 ore la plantule cu 3-4 frunze n-a condus la restabilirea fertilității masculine la nici una din plantele tratate (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Eficiența de dublare a numărului de cromozomi la plantule haploide în condiții de câmp prin procedeul „găurire”

Genotip	Concentrație, %	Expoziție, ore	Număr de frunze	Plante, %	
				Fertile	Cu boabe
n(MK109)	0,06	12	3	7,4	3,7
			4	9,4	0,0
		24	3	0,0	0,0
			4	40,0	0,0
	0,12	12	3	38,5	7,7
			4	42,9	21,4
		24	3	16,7	0,0
			4	20,8	4,2
n(Rf7 x Ky123)	0,12	12	3	36,1	22,2
			4	41,6	19,4
n(Ky123) control	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	10,1	8,5

Utilizarea concentrației de 0,12% colchicină la tratarea haploizilor n(MK109) a demonstrat o eficiență de dublare mai sporită. Tratarea plantulelor la faza de 3 frunze și expoziția de 12 ore a permis obținerea a 38,5% plante fertile, cu un randament de 7,7% de plante cu boabe, astfel rata plantelor cu boabe fiind mai mică decât la martor, dar mai înaltă decât la concentrația de 0,06%, la aceeași etapă de dezvoltare. La administrarea reagentului la plantule cu 4 frunze s-au obținut 42,9% de plantele fertile, dintre care 21,4% au format boabe. Utilizarea aceleiași

concentrații, timp de 12 ore la tratarea haploizilor n(Rf7 x Ky123), de asemenea a demonstrat eficiență sporită. În cazul tratării haploizilor cu 3 frunze, din 36,1% plante fertile 22,2% au format boabe, iar a celor cu 4 frunze – 41,6% și 19,4%, respectiv [9].

Dublarea numărului de cromozomi la haploizi prin procedeul „tivitură”. Tratarea haploizilor n(MK109) cu colchicină de 0,06% la faza de 3 frunze timp de 12 ore a permis obținerea a 55,6% plante fertile și a 16,7% cu boabe. Administrarea reagentului la faza de 4 frunze a permis obținerea a 33,3% plante fertile și 5,6% cu boabe. În cazul majorării perioadei de tratare cu colchicină timp de 24 ore a haploizilor cu 3 și 4 frunze s-au obținut 12,5 și 42,85% plante cu panicul fertil, respectiv. În ambele cazuri, însă nu s-au constatat plante ce au format boabe (Tabelul 3.6).

Tabelul 3.6. Eficiența de dublare a numărului de cromozomi la plantule haploide în condiții de câmp prin procedeul „tivitură”

Genotip	Concentrație, %	Expoziție, ore	Număr de frunze	Plante, %	
				Fertile	Cu boabe
n(MK109)	0,06	12	3	55,6	16,7
			4	33,3	5,6
		24	3	12,5	0,0
			4	42,9	0,0
	0,12	12	3	33,3	6,7
			4	25,0	0,1
		24	3	21,1	7,6
			4	21,4	0,0
n(Rf7 x Ky123)	0,12	12	3	9,7	3,2
			4	17,4	4,3
n(Ky123) control	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	10,1	8,5

Dublarea numărului de cromozomi la haploizii n(MK109) cu colchicină de 0,12% a demonstrat o eficiență de dublare mai redusă, comparativ cu concentrația de 0,06%. Administrarea reagentului timp de 12 ore la plantule cu 3 frunze a permis obținerea a 33,3% plante fertile și 6,7% plante cu boabe, iar la plantule cu 4 frunze: 25 și 0,01%, respectiv. O rată de 21,1% de plante fertile și 7,63% de boabe s-a obținut la tratarea haploizilor cu 3 frunze timp de 24 ore. În cazul administrării colchicinei timp de 24 ore la haploizii cu 4 frunze, din 21,4 % de plante fertile nici una nu a produs boabe. Dublarea numărului de cromozomi la haploizii n(Rf7 x Ky123) cu colchicină de 0,12% timp de 12 ore, de asemenea a prezentat rezultate nesemnificative. Administrarea reactivului la faza de 3 frunze a favorizat obținerea a 9,7% plante

fertile și 3,2% plante cu boabe, iar pentru faza de 4 frunze s-au obținut valori de 17,4% și 4,3%, respectiv (Tabelul 3.6).

Procedeeul “*absorbție*” a demonstrat rezultate ne semnificative în raport cu varianta martor. Rata joasă de plante cu panicul fertil care au format boabe face plauzibilă supoziția, că acțiunea reagentului în zona intactă de creștere este ineficientă pentru inhibarea dividerii mitotice a celulelor.

Precum s-a menționat, metoda de dublare a cromozomilor în condiții de laborator este cel mai frecvent utilizată la obținerea liniilor DH. Totuși, în baza rezultatelor obținute s-a constatat, că o eficiență mai înaltă la restabilirea fertilității masculine la plantele haploide demonstrează metoda de dublare a cromozomilor în condiții de câmp [5, 7]. De rând cu faptul că permite obținerea unui procent mai mare de plante fertile, metoda este simplă la realizare și nu necesită echipament tehnic sofisticat. Prin autopolenizarea plantelor dublu haploide s-au format linii homozigote, inclusiv pentru indicii morfologici.

Astfel ca rezultat al cercetărilor, a fost elaborat conceptul de eficientizare a tehnologiei de creare a liniilor homozigote de porumb care prevede:

1) crearea noilor inductori de haploizi din populația segregantă a liniilor inductoare încrucișate cunoscute – MHI x (Stock 6 x ZMS) ce implică selectări și autopolenizări în generațiile $F_3 - F_6$;

2) consolidarea sistemului de gene marker ale pigmentării antocianice și ameliorarea unor caractere cantitative valoroase în cadrul selectărilor și autopolenizărilor;

3) încrucișarea inductorilor creați cu plantele donor (materne):

4) obținerea haploizilor;

5) dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide cu colchicină în condiții de câmp;

6) obținerea și multiplicarea plantelor dublu haploide care genetic sunt linii complet homozigote.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii

1. A fost elaborat conceptul de eficientizare a tehnologiei de creare a liniilor homozigote de porumb care prevede: a) crearea noilor inductori de haploizi din populația segregantă a liniilor inductoare cunoscute – MHI x (Stock 6 x ZMS) ce implică selectări și autopolenizări în generațiile $F_3 - F_6$; b) consolidarea sistemului de gene marker ale pigmentării antocianice în boabe și plantule, și ameliorarea unor caractere cantitative valoroase; c) încrucișarea inductorilor creați cu plantele donor (materne) și obținerea haploizilor; d) dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide cu colchicină în condiții de câmp; e) obținerea și multiplicarea plantelor dublu haploide care genetic sunt linii complet homozigote.

2. Au fost create 3 linii de inductori, numite *Linie Haploid Inductoare* (LHI) cu un randament de inducere a haploizilor materni de 10,0 ... 15,8%, efectul depinzând și de sursa donor, ceea ce relevă rolul important al interacțiunilor *donor x inductor* la formarea acestora. Rata haploizilor induși pe fondalul donatorilor *dentiformis* este de aproximativ 2 ori mai înaltă decât pe fondalul *indurata*. Analiza descendenților F_3 și F_4 , proveniți din încrucișările liniilor inductoare Stock 6, ZMS și MHI a demonstrat că capacitatea de inducere a haploizilor la porumb este controlată de diverse sisteme genice – acțiunea multiplă a genelor, oligogene sau gene dominante.

3. La inductorii LHI creați, s-au consolidat într-un sistem unic genele marker ale sintezei antocianului în boabe (*RI-nj*) și plantule (*BI*, *PII*) de porumb, fapt care a contribuit la eficientizarea și sporirea preciziei de identificare a genotipurilor haploide. Coeficientul de corelație a manifestării acestor gene este 0,65* ($p \leq 0,05$). În cazul expresiei pronunțate a genei *RI-nj* haploizii de porumb pot fi selectați la etapa de boabe uscate, iar în cazul pigmentării antocianice slabe a endospermului și embrionului, identificarea urmează a fi efectuată suplimentar la etapa de plantule de 3-4 zile, în baza expresiei genelor *BI* și *PII*.

4. Prin analiză clusteriană s-a constatat că cele mai performante linii inductoare de haploizi F_6 care manifestă, totodată, valori înalte pentru asemenea caractere ca *înălțimea plantei*, *lungimea paniculului*, *cantitatea de polen*, *durata înfloririi paniculului*, au prezentat similitudine mai înaltă cu linia MHI, decât cu ZMS sau Stock 6.

5. Ameliorarea caracterelor cantitative la liniile LHI a sporit eficientizarea procesului de obținere a haploizilor materni datorită paniculului totalmente fertil, cantității considerabile de polen (0,19-0,32 g/zi) pe o durată de mai multe zile (până la 6), ceea ce face posibilă realizarea unui număr mai mare de încrucișări la nivel *donor x inductor*.

6. Aprecierea ratei (%) haploizilor obținuți la încrucișarea liniei LHI 7 cu diferiți donori în dependență de ziua polenizării știulețelor a demonstrat că cel mai înalt nivel al acestora (14,5%) s-a manifestat la ziua 2 de la apariția mătasei. Frecvența de formare a boabelor haploide este mai înaltă la vârful știulețului. Analiza corelațională a demonstrat lipsa dependenței între frecvența de formare a boabelor haploide la vârful și baza știulețului, în cazul polenizării la ziua 2 de la apariția mătăsii, ceea ce relevă că distribuția boabelor haploide, preponderent la extremitățile știulețului, este controlată de 2 sisteme genetice independente.

7. În baza analizei fenomenului de heterofertilizare și capacității polenului inductorilor de haploidie de a iniția dezvoltarea diferitelor variante de boabe (hibride, haploide, fără endosperm, fără embrion) a fost confirmată supoziția că mecanismul de inducere a haploizilor materni la porumb constă în fecundarea singulară – fecundarea de către un spermiozoid doar a celulei centrale din sacul embrionar al sursei donor.

8. Pentru crearea liniilor dublu haploide de porumb s-a optimizat procedeul de dublare a numărului de cromozomi prin administrarea inhibitorului mitotic colchicina în concentrație de 0,12% timp de 12 ore, găurind zona de creștere a plantulelor în condiții de câmp, care asigură obținerea a 36,1% plante fertile și 22,2% de plante cu boabe.

9. Analiza unor indici biometrici de bază – înălțimea plantei, lungimea știulețului, numărul rândurilor de semințe la liniile homozigote de porumb obținute prin tehnologia DH a demonstrat încadrarea acestora în limitele normale ale liniilor homozigote obținute pe cale tradițională: prin selectări repetate timp de 6-8 ani. Luând în considerație termenul restrâns de creare a liniilor DH, putem menționa avantajele economice evidente ale tehnologiei optimizate de obținere a liniilor homozigote.

Recomandări practice

1. Pentru eficientizarea obținerii haploizilor materni de porumb se propun liniile inductoare LHI 2, LHI 3, LHI 7, cu o rată de inducere de 10,0 ...15,8% și care dețin un sistem de gene marker în baza căruia are loc identificarea exactă a plantelor haploide.

2. În scopul creării liniilor dublu haploide de porumb se recomandă procedeul de dublare a numărului de cromozomi la haploizi în condiții de câmp, prin găurirea zonei de creștere a plantulelor de 3-4 frunze și administrarea inhibitorului mitotic colchicina în concentrație de 0,12% timp de 12 ore, care afectează mai puțin viabilitatea plantulelor decât procedeul cunoscut din stadiul anterior.

Aportul personal. Elaborarea schemei de creare a inductorilor de genotipuri haploide de porumb cu randament înalt care dețin, totodată, caractere calitative și cantitative valoroase, și criteriilor de selectare a acestora în descendențele segregante, analiza, interpretarea rezultatelor, elaborarea concluziilor și recomandărilor practice aparțin autorului tezei.

BIBLIOGRAFIE

1. Micu V. Ameliorarea plantelor necesită ameliorare. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2015, nr. 2(326), p. 111-118.
2. Palii A., Bafîru Gr., Rotari A. ș. a. Evaluarea efectului biochimic al mutației opaque-2 în genomul porumbului tetraploid. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2012, nr. 1(316), p. 118-125.
3. Palii A., Rotari A., Comarov G. ș. a. Manifestarea heterozisului la porumb în condiții de secetă. În: Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor. Chișinău: Tipografia Centrală, 2008, p. 154-158.
4. Partas E., Mihalachi A. Analiza genetică a unor surse cu limbul frunzei striat transversal din colecția de mutații de porumb. În: Genetica și ameliorarea plantelor, animalelor și microorganismelor: Materialele congr. VIII al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, 29-30 sept. 2005. Chișinău: Tipografia Centrală, 2005, p. 164-168.
5. Rotarencu V., **Sarmaniuc M.**, Popescu V. ș. a. Dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide de porumb. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2010, nr. 1(310), p. 39-43.
6. **Sarmaniuc M.** Posibilități de ameliorare a liniilor de inducere a haploizilor la porumb. În: Studia Universitatis. Seria Științe ale Naturii, 2009, nr.1(21), p. 161-163.
7. **Sarmaniuc M.** Dublarea cromozomilor la plantele haploide de porumb. În: Congresul al IX-lea Național cu participare internațională al Geneticienilor și Amelioratorilor: Teze. Chișinău: Tipografia Centrală, 2010, p. 138.
8. **Sarmaniuc M.** Recombinarea diferitor inductori, ca sursă de obținere a noilor linii de inducere a haploizilor la porumb (*Zea mays* L.). În: Conferința științifică "Genetica și Fiziologia rezistenței Plantelor": Teze. Chișinău: Tipografia Centrală, 2011, p.114.
9. **Sarmaniuc M.**, Mihailov M., Rusu G. Eficiența noilor inductori în obținerea haploizilor materni la porumb (*Zea mays* L.). În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2013, nr. 2(230), p 105-110.

10. **Sarmaniuc M.** Influența germoplasmei materne și perioadei polenizării știuleților asupra ratei de haploizi produsă de liniile inductoare la porumb (*Zea mays* L.). În: Universitatea Agrară de Stat din Moldova. Lucrări științifice, vol. 41, Agronomie. Chisinau: CE UASM, 2014, p. 108-111.
11. Компьютерная биометрика. М: Изд-во Моск. ун-та, 1990, 232 с.
12. Тырнов В., Завалишина А. Индукция высокой частоты возникновения матроклиных гаплоидов у кукурузы. В: Доклады Академии Наук СССР, 1984, т. 276, с. 735-738.
13. Чалык С. Методы гаплоидии в генетике и селекции у кукурузы. Кишинёв: Изд. Центр ГАУМ, 2003, 179 с.
14. Amzallag J. Critical period as fundamental events in life. In: Theory in Bioscience, 2004, vol. 123, p. 17-32.
15. Carlini-Garcia L.A., Vencovsky R., Siqueira Guedes Coelho A. Factorial analysis of bootstrap variances of population genetic parameter estimates. In: Genetic Molecular Biology, 2006, vol. 29, nr 2. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000200019>. (Vizitat: 21.03.2015).
16. Chalyk S. et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid induction in maize. In: Maize Genetic Cooperation News Letter, 2003, vol. 77, p. 29-30.
17. Chase S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). In: The Botanical Review, 1969, vol. 35, p. 117-167.
18. Coe E. Anthocyanin genetics. In: The Maize Handbook. 1994, p. 279-281.
19. Coe E. The properties, origin and mechanism of conversion-type inheritance at the *b1* locus in maize. In: Genetics, 1966, vol. 53, p. 1035-1063.
20. Coe E., Sarkar K. The detection of haploids in maize. In: J. Heredity, 1964, vol. 55, p. 231-233.
21. Deimling S., Rober F., Geiger H. Methodik und genetik der *in vivo* Haploindeninduktion bei Mais. In: Vortr Pflanzenzuchtg, 1997, vol. 38, p. 203-224.
22. Eder J., Chalyk S. In vivo haploid Induction in maize. In: Theoretical and Applied Genetics, 2002, vol. 104(4), p. 703-708.
23. Geiger H. Doubled Haploids. In: Genetics and Genomics II, 2009, p. 641–657.
24. Greenblatt I., Bock M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. In: J. Heredity, 1967, vol. 58, p. 9-13.

25. Hallauer A., Carena M., Miranda F. Quantitative Genetics in Maize Breeding. New York: Springer, 2010, 663 p.
26. Hüntzschel K. Bestimmung und Optimierung von Colchicin-Alternativen für die Doppelhaploiden-Technik bei Mais (*Zea mays* L.). Ph. D. Thesis, Hohenheim, Germany, 2011, 110 p.
27. Kebede A. et al. Effect of source germplasm and season on the in vivo haploid induction rate in tropical maize. In: Euphytica, 2011, vol. 180, p. 219-226.
28. Nadarajan N., Gunasekaran M. Quantitative Genetics and Biometrical Techniques in Plant Breeding. In: Kalyani Publishers, 2005, p. 27-28.
29. Nanda D., Chase S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). In: Crop Science, 1966, vol. 6, p. 213-215.
30. Prigge V. Implementation and optimization of the doubled haploid technology for tropical maize (*Zea mays* L.) breeding programs. Ph. D. Thesis, Hohenheim, 2012, 55 p.
31. Ribadia K. et al. Genetic diversity in macaroni wheat (*Triticum durum* Desf.). In: J. Maharashtra Agricultural University, 2007, vol. 32, p. 32-34.
32. Röber F., Gordillo G., Geiger H. In vivo haploid induction in maize. Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. In: Maydica. 2005, vol. 50, p. 275-283.
33. Rotarencu V., Dicu G., **Sarmaniuc M.** Induction of maternal haploids in maize. In: Maize Genetic Cooperation, 2009, p. 15-17.
34. **Sarmaniuc M.** The recombination of different inducers, as source of new haploid induction lines creation in maize. В: Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция). Москва: Россельхозакадемия, 2011, т. IV, часть II, p. 161-164.
35. **Sarmaniuc M.**, Lupașcu G. Important quantitative characters of maternal haploid inducer lines in maize (*Zea mays* L.). In: The Xth International Congress of Geneticists and Breeders: abstract book, 28 June – 1 July 2015, Chișinău, Republic of Moldova. Chișinău: ArtPoligraf, 2015, p. 140.
36. Zadfar P., Golabadi M. Genetic Variability Assessment in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars under Different Drought Stress Treatments using Multivariate Statistical Analysis. In: International J. of Agriculture Innovational and Research, 2013, vol. 2, Issue 3, p. 370-372.

PUBLICAȚII LA TEMA TEZEI

Articole științifice în reviste de profil din țară (categoria B)

1. Rotarenco V., **Sarmaniuc M.**, Popescu V., Cliciuc D., Mihailov M., Maslobrod S., Jacotă A. Dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide de porumb. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2010, nr. 1(310), p. 39-43.
2. **Sarmaniuc M.**, Mihailov M., Rusu G. Eficiența noilor inductori în obținerea haploizilor materni la porumb (*Zea mays* L.). În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2013, nr. 2(230), p. 105-110.

Articole științifice în reviste de profil din țară (categoria C)

3. **Sarmaniuc M.** Posibilități de ameliorare a liniilor de inducere a haploizilor la porumb. În: Studia Universitatis. Seria Științe ale Naturii, 2009, nr.1(21), p. 161-163.

Articole în reviste de peste hotare

4. Rotarenco V., Dicu G., **Sarmaniuc M.** Induction of maternal haploids in maize. In: Maize Genetic Cooperation, 2009, p. 15-17.

Articole în culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale

5. **Sarmaniuc M.** The recombination of different inducers, as source of new haploid induction lines creation in maize. В: Культурные растения для устойчивого сельского хозяйства в XXI веке (иммунитет, селекция, интродукция). Москва: Россельхозакадемия, 2011, т. IV, часть II, p. 161-164.

Articole în culegeri de lucrări ale conferințelor naționale

6. **Sarmaniuc M.** Influența germoplasmei materne și perioadei polenizării știuleților asupra ratei de haploizi produsă de liniile inductoare la porumb (*Zea mays* L.). În: Universitatea Agrară de Stat din Moldova. Lucrări științifice, vol. 41, Agronomie. Chișinău: CE UASM, 2014, p. 108-111.

Teze la conferințe internaționale din țară

7. **Sarmaniuc M.** Dublarea cromozomilor la plantele haploide de porumb. În: Congresul al IX-lea Național cu participare internațională al Geneticienilor și Amelioratorilor: Teze. Chișinău: Tipografia Centrală, 2010, p. 138.
8. **Sarmaniuc M.** Recombinarea diferitor inductori, ca sursă de obținere a noilor linii de inducere a haploizilor la porumb (*Zea mays* L.). În: Conferința științifică națională cu participare internațională „Genetica și Fiziologia rezistenței plantelor”: Teze. Chișinău: Tipografia Centrală, 2011, p. 114.
9. **Sarmaniuc M., Lupașcu G.** Important quantitative characters of maternal haploid inducer lines in maize (*Zea mays* L.). In: The Xth International Congress of Geneticists and Breeders: abstract book, 28 June – 1 July 2015, Chișinău, Republic of Moldova. Chișinău: ArtPoligraf, 2015, p. 140.

ADNOTARE

Sarmaniu Mariana “Eficientizarea tehnologiei de creare a liniilor homozigote de porumb (*Zea mays* L.)”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2015. Teza constă din introducere, 3 capitole, concluzii, recomandări, bibliografie din 258 surse, anexă, volumul total fiind de 136 pagini, conține 31 tabele și 48 figuri. Rezultatele cercetărilor sunt publicate în 9 lucrări științifice. **Cuvinte cheie:** porumb, tehnologii, inductori, haploizi, gene marker antocianice, dublarea numărului de cromozomi, linii dublu haploide, linii homozigote.

Domeniu de studiu: Genetică vegetală.

Scopul lucrării a constat în eficientizarea tehnologiei de creare a liniilor homozigote prin explorarea fenomenului de inducere a haploizilor materni la porumb (*Zea mays* L.). **Obiective:** majorarea ratei de inducere a haploizilor; consolidarea sistemului de gene marker, pentru eficientizarea procesului de identificare a haploizilor la diferite faze de dezvoltare din varietăți diverse de porumb; ameliorarea caracterelor cantitative la inductorii de haploidie (înălțimea plantei, lungimea paniculului, durata înfloririi paniculului, cantitatea de polen, rezistența la cădere, boli și vătămători) ce influențează semnificativ numărul de încrucișări; elucidarea mecanismelor de inducere a haploizilor; optimizarea tehnicii de dublare a numărului de cromozomi la plantele haploide prin utilizarea inhibitorului mitotic – colchicina. **Noutatea științifică a rezultatelor:** Pentru prima dată s-au creat linii cu rată de inducere a haploizilor de 10-15% care dețin un sistem eficient de gene marker al antocianului (*R1-nj*, *BI*, *PII*), expresia cărora permite identificarea exactă a haploizilor la diferite faze de dezvoltare a genotipurilor de porumb, iar caracterelor cantitative ameliorate ale liniilor favorizează efectuarea unui număr mare de încrucișări. **Importanța teoretică a lucrării.** Rezultatele obținute referitor la analiza heterofertilizării, capacității gametofitului masculin de a induce dezvoltarea diferitelor variante de boabe, influența perioadei de polenizare a știuleților contribuie la explicarea mecanismului de formare a haploizilor prin utilizarea liniilor inductoare de haploidie la porumb. **Problema științifică soluționată** constă în *fundamentarea științifică* a conceptului de eficientizare a tehnologiei de creare a liniilor dublu haploide în *vederea explorării dirijate* a sistemului de gene marker al sintezei antocianului, sporirii performanței caracterelor cantitative și optimizării procedurii de dublare a numărului de cromozomi, *fapt care a contribuit* la majorarea randamentului de obținere a genotipurilor haploide și reducerea termenului de creare a liniilor homozigote de porumb. **Valoarea aplicativă a rezultatelor.** Liniile LHI pot fi utilizate în procesul de obținere a haploizilor materni din diferite genotipuri de interes genetic și ameliorativ. Pentru restabilirea fertilității a fost optimizat procedeul de dublare a cromozomilor la plantulele haploide cu colchicină direct în condiții de câmp. **Implementarea rezultatelor științifice:** în programele de ameliorare a porumbului la Institutul de Fitotehnie “Porumbeni” și Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM.

АННОТАЦИЯ

Сарманюк Марианна «Повышение эффективности технологии создания гомозиготных линий кукурузы (*Zea mays* L.)», диссертация доктора биологических наук, Кишинэу, 2015. Диссертация состоит из введения, 3-х глав, выводов, рекомендаций, библиографии, включающей 258 источника, общий объем – 136 страниц, содержит 31 таблиц и 48 рисунков. Результаты исследований опубликованы в 9 научных работах. **Ключевые слова:** кукуруза, технологии, индукторы, гаплоиды, маркерные гены антоциана, дублирование количества хромосом, двойные гаплоидные линии, гомозиготные линии.

Область исследований: Генетика растений.

Цель работы: повышение эффективности технологии создания гомозиготных линий путем индуцирования материнских гаплоидов у кукурузы (*Zea mays* L.).

Задачи: повышение выхода индукторов; оптимизация генетической системы идентификации гаплоидов на разных этапах развития различных разновидностей кукурузы; улучшение количественных признаков у гаплоидных индукторов (высота растения, длина метелки, продолжительность цветения, количество пыльцы, устойчивость к полеганию, мужская фертильность), влияющих существенно на количество возможных скрещиваний; выявление механизма индукции гаплоидов; оптимизация техники дублирования количества хромосом у гаплоидных растений при помощи ингибитора митоза – колхицина.

Научная новизна: впервые были созданы линии с высокой способностью индукции гаплоидов – до 10-15% и системой маркерных генов антоциана (*R1-nj*, *B1*, *Pl1*), экспрессия которых позволяет эффективно идентифицировать гаплоиды на разных этапах развития кукурузы, а улучшенные количественные признаки способствуют осуществлению большого количества скрещиваний.

Теоретическое значение: полученные результаты относительно анализа гетерофертилизации, способности мужского гаметофита индуцировать различные варианты семян, влияния периода опыления початков на выход гаплоидов способствуют выявлению механизма развития гаплоидов при использовании линий-индукторов.

Решенная важная научная проблема состоит в *научном обосновании* концепции повышения эффективности создания дигаплоидных линий у кукурузы *для целенаправленного использования* системы маркерных генов синтеза антоциана, улучшения количественных признаков и оптимизации способа дублирования количества хромосом, *что способствовало* повышению выхода гаплоидных генотипов и сокращению времени для создания гомозиготных линий кукурузы.

Практическое значение: линии LHI (*Linie Haploid Inductoare*) могут быть использованы для получения материнских гаплоидов из различных генотипов, представляющих генетический и селекционный интерес. Для восстановления фертильности предлагается способ дублирования количества хромосом у гаплоидных растений при помощи колхицина в полевых условиях.

Внедрение научных результатов: в селекционных программах кукурузы Института растениеводства “Pogumbeni” и Института генетики, физиологии и защиты растений АНМ.

SUMMARY

Sarmanic Mariana “The efficientization of creation technology of maize homozygous lines (*Zea mays* L.)”, Thesis in Biology, Chişinău, 2015. The thesis consists of introduction, 3 chapters, conclusions and recommendations, bibliography 258 titles, contains 136 pages, 31 tables, 48 figures. The results of the research are published in 9 scientific papers.

Key-words: maize, technology, inducers, haploids, anthocyanin marker genes, chromosome doubling, doubled haploid lines, homozygous lines.

Research domain: Plant genetics.

The goal of the research: the efficientization of creation technology of maize homozygous lines by exploring of maternal haploids induction in maize (*Zea mays* L.). **The objectives:** increase the haploid induction rate; strengthening the genetic system of haploids identification at various stages of development from different corn varieties; the improvement of quantitative traits of haploid inducer (plant height, tassel length, duration of tassel flowering, amount of pollen, plant resistance to falls, male fertility) that significantly influence the number of crossings; elucidation of the haploid induction mechanism; optimization of technique for chromosomes doubling in haploid plants with mitotic inhibitor – colchicines. **Scientific novelty:** were created, for the first time, lines with haploid induction rate of 9-15%, with anthocyanin marker genes system (*R1-nj*, *B1*, *P11*) which allows efficient identification of haploids at different stages of development in different genotypes of maize, and improved quantitative traits favors making a large number of crossings. **Theoretical significance:** the results of hetero-fertilization analysis, male gametophyte ability to develop different kind of seeds, influence of pollination period of ears on haploid rate may help to explain the mechanism of haploid lines development using inducers. **The important scientific problem solved** consist in the **scientific fundamenting** of the efficientization concept of creation technologies of double haploid lines **in order of a controlled exploring** of marker genes system of anthocyan synthesis, the increase of the performance of quantitative characters and the optimization of chromosomes doubling process, **fact which contributed** to the increase of haploid genotypes yield obtaining and reducing the creation period of homozygous lines. **Applicative value:** LHI lines can be fully used in production of maternal haploids from different genotypes with genetic and ameliorative interest. To restore male fertility was optimized the colchicines treatment of haploid plantlets directly under field conditions, as method of chromosomes doubling. **Implementation of scientific results:** in maize breeding programs in the Phytotechnical Institute „Porumbeni” and Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection of ASM.

SARMANIUC Mariana

**EFICIENTIZAREA TEHNOLOGIEI DE CREARE A LINIILOR
HOMOZIGOTE DE PORUMB (*ZEА MAYS L.*)**

162.01. Genetică vegetală

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice