

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

Cu titlu de manuscris:

C.Z.U. 633.15 : 631.52 (478) (043.2)

SARMANIUC Mariana

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

162.01. Genetică vegetală

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

Lupașcu Galina,

doctor habilitat în biologie,
profesor cercetător

Autorul:

Sarmaniuc Mariana

Chișinău, 2015

©Sarmaniuc Mariana, 2015

CUPRINS

ADNOTARE (română, rusă, engleză)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. FENOMENUL DE HAPLOIDIE – EXPLORAREA ÎN GENETICA ȘI AMELIOAREA CULTURILOR AGRICOLE	16
1.1. Istoricul și clasificarea haploizilor. Caracteristici ale plantelor haploide	16
1.2. Crearea sistemului genetic de identificare a haploizilor	17
1.3. Modalități de majorare a frecvenței haploizilor	20
1.4. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor	21
1.4.1. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor materni	21
1.4.2. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor androgeni	24
1.5. Aspecte genetice ale fenomenului de inducere a haploizilor materni	26
1.6. Avantaje și perspective la utilizarea plantelor haploide și dublu haploide (DH)	30
1.6.1. Dublarea garniturii de cromozomi la plante haploide	33
1.6.2. Utilizarea plantelor haploide în ameliorare	38
1.7. Concluzii la capitolul 1	42
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE	44
2.1. Material de studiu și condiții de cultivare	44
2.2. Aprecierea capacității de inducere a haploizilor	48
2.3. Analiza fenologică a expresiei genelor <i>BI</i> , <i>PII</i> și <i>RI-nj</i> la descendenții segreganți	49
2.4. Metode de dublare a numărului cromozomilor cu colchicină la plantele haploide	51
2.5. Analiza matematico-statistică a datelor	52
2.6. Concluzii la capitolul 2	53
3. INDUCEREA HAPLOIDIEI <i>IN VIVO</i> – EFICIENȚA NOILOR LINII INDUCTOARE ȘI CREAREA LINIILOR DUBLU HAPLOIDE DE PORUMB (<i>Zea mays</i> L.)	55
3.1. Tehnologia de creare a liniilor inductoare de haploizi materni	56
3.1.1. Îmbunătățirea capacității de inducere a haploizilor	56
3.1.2. Analiza variației genetice a capacității de inducere a haploizilor	65
3.1.3. Consolidarea sistemului genetic de identificarea haploizilor	68
3.1.4. Ameliorarea caracterelor cantitative la liniile cu capacitate de inducere a haploizilor	73
3.1.5. Liniile LHI (<i>Linie Haploid Inductoare</i>) cu capacitate de inducere a haploizilor materni	81

3.2. Mecanisme ale fenomenului de inducere a haploizilor materni	92
3.2.1. Fenomenul de heterofertilizare în procesul inducerii haploizilor	93
3.2.2. Capacitatea gametofitului masculin de a induce dezvoltarea diferitelor variante de boabe	96
3.3. Utilizarea diferitelor metode de dublare a numărului de cromozomi la crearea liniilor homozigote de porumb	98
3.4. Concluzii la capitolul 3	107
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE	110
BIBLIOGRAFIE	113
ANEXE	132
Anexa 1. Acte de implementare în practică a rezultatelor științifice	132
DECLARAȚIE PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	134
CURRICULUM VITAE	135

ADNOTARE

Sarmaniuc 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 panicului, 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*, *B1*, *PI1*), 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 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 “Porumbeni” и Института генетики, физиологии и защиты растений АНМ.

SUMMARY

Sarmaniu 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 anthocyanins 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.

LISTA ABREVIERILOR

- A1, a1* – Anthocyaninless 1 (*Lipsa antocianului 1*)
A2, a2 – Anthocyaninless 2 (*Lipsa antocianului 2*)
A3, a3 – Anthocyaninless 3 (*Lipsa antocianului 3*)
As 1 - Asynaptic 1
B1 – Colored brown plant (Plantă cu colorație brună)
Bz1 – Bronze 1 (Bronz 1)
Bz2 – Bronze 2 (Bronz 2)
C1 – Colored aleurone 1 (Aleuronă colorată 1)
C1-I – Dominant inhibitor (Inhibitor dominant)
C2, – Colorless 2 (Lipsa colorației)
C2-Idf – Dominant inhibitor (Inhibitor dominant)
Cl-1 – Chlorophyll 1 (Clorofilă 1)
DH – Dublu haploid
DMSO – Dimethyl sulfoxide
El 1 – Elongate 1 (Alungit 1)
Gl1, gl1 – Glossy 1 (Lucios 1)
Ig1, ig1 – Indeterminated gametophyte 1 (Gametofit nedeterminat 1)
lg1 – Liguleless 1 (Aligulat 1)
lg2 – Liguleless 2 (Aligulat 2)
MHI – Moldavian Haploid Inducer
PEM - Purple Embryonic Marker (Marker Embrionar Purpuriu)
Pl1 – Purple plant 1 (Plantă purpurie 1)
Pr1 - Red aleurone 1 (Strat aleuronic roșu 1)
QTL – Quantitative Trait Loci (Locus al Caracterelor Cantitative)
R1 – Red 1 (Roșu 1)
R1-nj – R-novaho
RFLP – Restriction Fragments of Length Polymorphism (Polimorfismul Lungimilor Fragmentelor de Restricție)
Rgl- Ragged leaves 1 (Frunze neregulate 1)
UV – Raze ultraviolete
ZMS – Zarodîșevii Marker Saratovschii
ЗМС – Зародышевый Маркер Саратовский
КМС – Коричневый Маркер Саратовский

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei. Porumbul (*Zea mays* L.) este utilizat în alimentația omului și furajarea animalelor, în calitate de biocombustibil și are aplicabilitate largă la nivel industrial. Cultura de porumb reprezintă un important produs alimentar alături de grâu (*Triticum aestivum* L.) și orez (*Oryza sativa* L.), fiind o sursă bogată de calorii pentru majoritatea oamenilor ce locuiesc într-un șir de țări cu nivel precar de viață din Africa, Asia, America [195].

În ultimul timp, în agricultura mondială au loc schimbări esențiale la nivelul diferitelor culturi. Producerea boabelor de porumb este concentrată pe creșterea producției agricole pentru satisfacerea consumatorilor din întreaga lume, care sunt în continuă creștere; îmbunătățirea calității produselor alimentare, pentru a asigura o viață cu nivel calitativ înalt; pe utilizarea cariopselor ca surse rentabile de combustibil. În contextul acestor deziderate, cercetările sunt orientate spre obținerea de noi forme genetice cu caractere economic valoroase [176].

Este demonstrat că peste 50% din progresul obținut în agricultură în lume, în ultimii 50 de ani, se datorează creării și implementării de noi soiuri și hibrizi, dar Republica Moldova comparativ cu nivelul mondial, la acest capitol este într-un dezavantaj pronunțat [2]. Din aceste considerente, crearea și promovarea hibrizilor competitivi și producerea de semințe calitative sunt obiective de mare importanță în agricultura modernă. Producerea hibrizilor de porumb cu productivitate înaltă este un rezultat creativ al îmbinării reușite a bazelor teoretice și practice ale fenomenului de heterozis [4].

În agricultura modernă, la cultivarea porumbului se utilizează hibrizii și varietățile cu polenizare liberă, producătorii selectând din acestea, genotipuri adaptate la anumite condiții de mediu, și cu avantaje de ordin economic. Hibrizii sunt creați prin încrucișarea plantelor autopolenizate timp de 6-10 generații, în scopul obținerii liniilor consangvinizate, homozigote [120]. Prin urmare, cheia dezvoltării accelerate a genotipurilor ameliorate este reducerea timpului necesar creării liniilor homozigote. Acest deziderat a devenit realizabil datorită aplicării tehnologiei liniilor dublu haploide (DH) [111, 195, 202]. Producerea liniilor DH din germoplasma heterozigotă este un proces, ce implică 2 generații. În prima generație, haploidia este indusă din plantele diploide, garnitura de cromozomi a acestora fiind redusă la jumătate. În a 2-a generație, setul haploid de cromozomi este dublat, fiecare cromozom obține o copie identică, iar garnitura diploidă este restaurată. 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 durata mai

multor ani [69, 96, 110, 195, 202, 249]. Autorii B.Forster, W.Thomas au raportat că tehnologia de dublare numărului de cromozomi la plantele haploide este utilizată în ameliorarea a peste 250 culturi, iar din 300 de varietăți cu polenizare liberă prin intermediul liniilor dublu haploide au fost create 12 specii noi [105].

Haploizii produși din plante diploide ($2n=2x$), cunoscuți și ca monoploizi conțin un set gametic de cromozomi în faza de sporofit ($2n=x$), posedă talie mică a plantei, demonstrează viabilitate redusă comparativ cu plantele donatoare și sunt sterili din cauza distorsionării meiozei care conduce la formarea gameților defectuoși, sai chiar la absența acestora [181].

Haploizii pot apărea spontan în natură, sau ca rezultat al diferitelor tehnici de inducție. De la prima atestare a plantelor haploide la *Datura stramonium* (LINN.) [54], apariția spontană a acestora a fost observată la multe alte specii [95, 104], însă datorită incidenței lor reduse, obținerea unui număr mare de linii DH este posibilă doar pe cale artificială – *in vivo*, sau *in vitro* [110].

Propagarea *in vitro* asigură multiplicarea rapidă a germoplasmei, crearea de genotipuri noi cu caractere valoroase și este utilizată pe larg în fitotehnie. Cultivarea *in vitro* a materialului vegetal (țesuturi meristemice, celule, embrioni imaturi) permite obținerea rapidă a clonelor organismelor valoroase [1]. Prin această tehnică, producerea haploizilor implică cultivarea gametofitului patern (antere, sau microspori) sau matern (ovule) pe medii de cultură, în condiții controlate, pentru a induce embriogeneza care va rezulta cu dezvoltarea plantelor haploide [232, 233].

La porumb, inducerea haploizilor prin cultură de antere reprezintă o metodă laborioasă și costisitoare, cu nivel scăzut de regenerare a plantei, din care cauză biotehnologia nu este aplicată pe larg în programele de producere a liniilor DH. Se menționează, totuși că potențialul regenerativ are un caracter genotipic [58, 227].

Producerea haploizilor *in vivo* poate fi obținută prin: (i) încrucișări interspecifice, cu aplicare largă la orz *Hordeum vulgare* (polenizarea cu *H. bulbosum*); [140] și grâu (polenizarea cu porumb); [159]; (ii) încrucișări cu polen tratat prin iradiere, căldură și/sau chimicale [95]; (iii) încrucișări cu genotip specific de inducere a haploidiei (inductori, sau *linii inductoare*) [74]. Aceasta din urmă a fost aleasă ca metodă de producere a haploizilor [110].

Inductorii prezintă genotipuri cu capacitate specifică de inducere a dezvoltării boabelor cu embrion haploid în rezultatul încrucișării cu planta diploidă (normală). Utilizarea inductorului ca formă maternă induce haploizi paterni [146], în timp ce folosirea acestuia ca polenizator duce

la dezvoltarea haploizilor materni [202]. Numărul de haploizi din descendența totală de boabe reprezintă „rata de inducere a haploizilor” de către inductorul utilizat [110, 195].

Abilitatea inductorilor de a induce genotipuri haploide *in vivo* la porumb este un caracter care răspunde la selecție și, totodată, oferă largi oportunități la crearea noilor linii în ultimele trei decenii [195]. Primul inductor de haploizi materni este Stock 6 care în încrucișări cu donorii demonstrează rată de 2-3% [85]. Ulterior acest inductor ancestral a stat la baza creării multor altor inductori în diferite instituții de profil din lume [22, 47, 63, 157, 175, 194, 202, 221, 249].

Un aspect esențial în utilizarea tehnologiei DH la crearea liniilor homozigote, constituie sistemul de diferențiere a boabelor, sau plantulelor haploide rezultate din inducerea haploidiei de cele dezvoltate prin fertilizare obișnuită [110]. În inductori au fost integrate gene dominante ce reglează sinteza antocianului în țesuturile din embrion și endosperm, plantă întregră la diferite faze de dezvoltare [77, 118, 183].

Tehnologia liniilor DH oferă o gamă vastă de avantaje pentru genetica, ameliorarea și producerea porumbului, cele mai importante fiind [69, 105, 110, 111, 124, 202]:

1. reducerea semnificativă (de 2-3 ori) a procesului de obținere a liniilor complet homozigote;
2. logistică simplificată, termeni restrânși, surse financiare reduse pentru obținerea și producerea liniilor homozigote, toate acestea favorizând realizarea și implementarea mai multor selecții pentru producerea accelerată a genotipurilor de elită;
3. selectarea eficientă și exactă a genotipurilor valoroase;
4. accelerarea obținerii liniilor cu alele favorabile ce controlează productivitatea și adaptarea la condiții de stres, mult mai dificil de realizat prin metodele convenționale;
5. definește perfect condițiile de distinctivitate, uniformitate, stabilitate pentru protecția varietății plantelor, datorită omogenității și homozigozității complete;
6. reduce eforturile de menținere a liniei în stare homozigotă;
7. în combinație cu markerii moleculari facilitează accesul la germoplasma maternă, sau paternă din liniile parentale ale formelor hibride.

Metoda de inducere a haploizilor *in vivo* poate fi considerată ca importantă o a treia realizare metodologică după tehnologia heterozisului și pepenierele anuale [220]. Ca rezultat, datorită multor avantaje și metodologiei relativ simple, tehnologia DH a înlocuit cu succes alte metode de obținere a liniilor homozigote în programele de producere industrială a porumbului în Europa [215], America de Nord [220], China [78] și America Centrală [193, 194].

Cu fiecare an, tehnologia liniilor DH avansează tot mai mult, tendința fiind determinată de necesitățile de plante haploide în continuă creștere. Industria porumbului poate fi însă afectată de unele dezavantaje ale inductorilor: rata redusă de obținere a haploizilor, expresia instabilă a genelor marker care controlează pigmentația antocianică, din care motiv diferențierea exactă a boabelor cu embrion haploid de cele cu embrion diploid este dificilă [194].

Odată cu mărirea diversității materialului de obținere a haploizilor, s-a constatat că germoplasma donatorilor poate influența puternic pigmentarea antocianică a embrionului și endospermului. În unele cazuri colorația este atât de slabă, încât haploizii și hibridii practic nu se deosebesc de boabele obișnuite maternelor [88, 145]. Un alt impediment constă în faptul că o parte considerabilă de inductori sunt predispuși la cădere, sensibili la boli, dăunători și posedă caractere cantitative slab ameliorate, din care motiv este pusă în dificultate realizarea unui număr mare de încrucișări și, respectiv, obținerea cantității necesare de boabe [194].

Majoritatea plantelor haploide sunt sterile, datorită distorsionărilor meiotice la formarea gameților [227]. Prin urmare, dublarea cromozomilor este necesară pentru restabilirea fertilității, autopolenizare și menținerea genotipului. La porumb, cel mai utilizat agent de dublare este alcaloidul *colchicina*, ce acționează ca inhibitor mitotic. În timpul diviziunii celulare, colchicina inhibă formarea fusului de diviziune, astfel în celulă rămâne numărul dublu de cromozomi fără divizarea acestora [121, 235].

La producerea liniilor DH au fost elaborate protocoale de tratare a haploizilor cu colchicină atât *in vivo* [91, 108], cât și *in vitro* [43, 240], de asemenea și metode alternative de tratare cu protoxid de azot [144] și erbicide cu efect de inhibare a mitozei [241]. Cu toate acestea, indiferent de metodă, dublarea artificială a cromozomilor la porumb este un proces foarte costisitor ce necesită condiții speciale. Metodele utilizate până în prezent au demonstrat eficacitate diminuată și afectare puternică a viabilității plantei. Din aceste cauze, doar un număr mic de plante își recapătă fertilitatea, iar plantele dublu haploide de obicei produc cantități insuficiente de polen pentru autopolenizare, ceea ce conduce la formarea unui număr mic de boabe pe știulete. Pentru obținerea eficientă a liniilor homozigote prin tehnologia DH, sunt necesare metode ce ar permite: 1) restabilirea fertilității masculine la un număr cât mai mare de plante; 2) reagentul de dublare a cromozomilor să afecteze cât mai puțin viabilitatea plantei; 3) procedeele de tratare să fie simple, cu cheltuieli minime [122].

Pentru sporirea eficienței tehnologiei liniilor DH în primul rând este necesară ameliorarea complexă a liniilor inductoare de haploidie. Paralel cu capacitatea de majorare a ratei haploizilor și consolidare a sistemului de gene marker, inductorii trebuie să posede anumite

performanțe ale caractere cantitative. Manifestarea fenotipică a genelor marker urmează să permită evidențierea exactă a haploizilor la diferite faze de dezvoltare, din diverse tipuri de germoplasmă fără eforturi și cheltuieli semnificative. Utilizarea inductorilor cu caractere cantitative valoroase poate spori randamentul de obținere a haploizilor, polenizarea manuală fiind înlocuită cu cea naturală – liberă; doar în așa caz, haploizii având perspective de producere pe suprafețe mari.

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 panicului, 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 (*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 procedului 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.

Aprobarea rezultatelor. 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, 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 tineri savanți „Elaborarea metodelor eficiente de dublare a numărului de cromozomi la plantele haploide de porumb” 09.819.04.04A (2009–2010) (AȘM) 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).

SUMARUL COMPARTIMENTELOR TEZEI

Teza cuprinde adnotări prezentate în limbile română, rusă și engleză, lista abrevierilor, introducere, trei capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, anexe, declarația privind asumarea răspunderii și CV.

În „**Introducere**” se argumentează actualitatea și importanța problemei abordate; sunt formulate scopul și obiectivele tezei; se descrie noutatea științifică a rezultatelor obținute; importanța teoretică, problema științifică soluționată și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul 1. „**Fenomenul de haploidie – explorarea în genetica și ameliorarea culturilor agricole**” – 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.

Capitolul 2. „**Material și metode de cercetare**” – sunt descrise materialul de studiu și condițiile de cultivare; aprecierea capacității de inducere a haploizilor; analiza fenologică a expresiei genelor *B1*, *P11*, *R1-nj* la descendenții segreganți; metodele de dublare a numărului de cromozomi cu colchicină la plantele haploide; analiza statistică a datelor obținute.

Capitolul 3. „**Inducerea haploidiei *in vivo* – eficiența noilor linii inductoare și crearea liniilor dublu haploide de porumb (*Zea mays* L.)**” – sunt prezentate date despre tehnologia de creare a liniilor inductoare de haploizi materni; îmbunătățirea capacității de inducere a haploizilor; analiza variației genetice a capacității de inducere a haploizilor; consolidarea sistemului genetic de identificare a haploizilor; ameliorarea caracterelor cantitative la liniile inductoare de haploizi (înălțimea plantei, lungimea paniculului, durata înfloririi paniculului, cantitatea de polen, rezistența la cădere, fertilitatea masculină) ce influențează numărul de încrucișări; mecanisme ale fenomenului de inducere a haploizilor materni; liniile LHI (*Linie Haploid Inductoare*) cu capacitate de inducere a haploizilor materni; fenomenul de heterofertilizare în procesul inducerii haploizilor; capacitatea gametofitului masculin de a induce dezvoltarea diferitelor variante de boabe; utilizarea unor metode de dublare a numărului de cromozomi la crearea liniilor dublu haploide de porumb; analiza comparativă a diferitelor procedee de tratare a haploizilor atât în condiții de câmp, cât și de laborator; utilizarea tehnologiilor statistice moderne la analiza datelor obținute și elaborarea sistem-suportului de decizii.

FENOMENUL DE HAPLOIDIE – EXPLORAREA ÎN GENETICA ȘI AMELIOAREA CULTURILOR AGRICOLE

1.1. Istoricul și clasificarea haploizilor. Caracteristici ale plantelor haploide

Haploizii reprezintă plante sau embrioni cu garnitura redusă de cromozomi (n), comparativ cu forma inițială ($2n$). Conform clasificării elaborate de C.C. Хохлов, В.С. Тырнов, Е.В. Гришина [24], haploizii se clasifică în trei tipuri:

- *haplozi matroclini (materni)* – se dezvoltă dintr-un ovul nefecundat, dețin nucleul și citoplasma unui gamet;
- *haploizii androclini (paterni)* – se dezvoltă dintr-o celulă a gametofitului masculin, conțin nucleul și citoplasma aceluiași gamet și se obțin doar experimental din cultura de antere;
- *haploizii androgeni* – se dezvoltă dintr-un ovul reduțional sau din altă celulă al sacului embrionar, în care cromozomii proprii sunt înlocuiți cu cromozomii nucleilor spermatici, acest tip de haploizi deținând nucleul unui gamet și citoplasma altui gamet.

Prima dată, plantele haploide au fost atestate la *Datura stramonium* [50], după care haploizii au fost detectați și la alte culturi, ca tutunul [84], triticale [106], tomatele, cartofii, soia, orzul etc. [141]. Autorii G. Kimber, R. Riley [147] au raportat despre depistarea haploizilor la cel puțin 71 specii, care aparțin la 39 genuri și 16 familii de angiosperme. Ulterior numărul acestora a crescut considerabil, fiind menționați pirul [211], piersicul [126, 234]; citricele [138, 246]; *Trillium* [Uchino, 1973]. Apariția spontană a haploizilor s-a semnalat de asemenea, și la unele specii de gimnosperme [131, 224].

Pentru prima dată haploizii la porumb au fost menționați de L.J Stadler în 1929. L. Randolph și L.J Stadler sunt considerați primii care au inițiat cercetări în domeniul haploidiei la porumb [197, 202, 219]. La plantele superioare, haploizii se deosebesc de omologii diploizi prin mai multe însușiri (Figura 1.1), cele mai evidente fiind: dimensiunile caracterelor morfologice diminuate datorită dimensiunilor mici ale celulelor, volumul acestora corespunzând cu nivelul de ploidie; toleranță redusă la condiții nefavorabile; sterilitate înaltă la nivel de panicul și știulete. De asemenea, plantele haploide sunt mai tardive, dezvoltându-se mult mai lent decât cele diploide. Gradul de haploidie, poate fi confirmat prin diferite metode, acestea incluzând, în primul rând, determinarea numărului de cromozomi. În prezent, se utilizează tehnici citologice convenționale și de stabilire a volumului de ADN prin citometrie de flux [55], cât și metode indirecte bazate pe dimensiunile celulelor de protecție și ale plastidelor [247].



Fig. 1.1. Dimensiunea plantelor haploide și diploide [194].

1.2. Crearea sistemului genetic de identificare a haploizilor

Începând cu anul 1946, una din problemele fundamentale în domeniul haploidiei a fost obținerea și identificarea haploizilor. Autorul S. Chase [75] a fost primul care a enunțat: „dacă rata haploizilor este de 1/1000 sau 1/2000, aceasta poate avea valoare practică doar în cazul când polenizatorul utilizat posedă un sistem genetic eficient de evidențiere a haploizilor”. Pentru identificarea haploizilor, autorul a utilizat un tester ce conține genele *a1*; *A2*; *B1*; *Pl1*; *C1*; *Rg1*; *Pr* [71]. Prezența genei recesive *a1* în stare homozigotă blochează sinteza antocianului, din care motiv testerul este de culoare verde, cu nuanță brună întunecată. La încrucișarea testerului cu genotipul ce conține gena dominantă *A1*, antocianul se va sintetiza în cantități suficiente pentru colorarea plantulelor și plantelor mature în purpuriu sau violet, astfel sistemul de gene marker permițând selectarea eficientă a haploizilor la faza de 3-4 frunze. Dat fiind faptul că haploizii materni se dezvoltă din ovule nefecundate, acestea sunt de culoare verde. Sistemul marker menționat a făcut posibilă identificarea unui număr mare de haploizi spontani, însă posedă și unele dezavantaje [73]. Înainte de însămânțare este necesară germinarea semințelor obținute din încrucișările cu testerul – *a1*. De menționat, că nu fiecare genotip utilizat în ameliorare sau genetică în scopul vizat posedă gena dominantă *A1*, iar în lipsa acesteia alela recesivă *a1* devenind în stare homozigotă, blochează sinteza antocianului. Identificarea haploizilor în așa caz

este dificilă, sau practic imposibilă de realizat. Un impediment la utilizarea acestui tester, prezintă și faptul că sinteza antocianului poate fi inhibată și de alte gene, care se întâlnesc în unele genotipuri de porumb: *Cl-1*, *C2-Idf* și *In1-D* [88].

Pentru identificarea haploizilor, cercetătorii francezi P. Lashermes, E. Couturon, A. Charrier (1988) au utilizat un alt sistem marker, în care în calitate de forme maternel s-au selectat genotipuri cu genele recesive – *lg1*, *lg2*, *gl1* ce controlează caracterul *frunze lucioase* și *neligulate*. La polenizarea genotipurilor ce nu dețineau markerii utilizați de P. Lashermes, s-au obținut plante hibride fără manifestarea caracterelor menționate. În cazul polenizării cu acest tester, la unele plante genele *lg1*, *lg2*, *gl* au avut o expresie fenotipică. Acestea sunt plantele haploide maternel dezvoltate din ovule nefecundate. Rata haploizilor obținuți a variat în limite destul de largi și a depins atât de polenizator, cât și de un șir de alți factori [157].

De menționat, că cercetătorii francezi au aplicat un sistem marker destul de original. Genele *lg1*, *lg2*, *gl1* deblochează sinteza antocianului, iar haploizii pot fi selectați independent de prezența sau lipsa genelor inhibitoare. Totuși, markerii propuși de P. Lashermes nu și-au găsit aplicarea în ameliorarea și genetica porumbului, întrucât haploizii pot fi selectați doar din materialul, ce conține genele recesive *lg1*, *lg2*, *gl1*. În lucrările amelioratorilor cât și a geneticienilor, cercetarea și îmbunătățirea liniilor și hibridilor de porumb din asemenea material se realizează destul de rar.

Totuși, există posibilitatea de identificare fenotipică a haploizilor la nivelul sistemului radicular. Autorul B. Тырнов a constatat că la faza de 3 frunze sistemul radicular la plantele haploide este de 1,5-2 ori mai scurt și mai subțire, decât la plantele diploide [21, 23]. Conform unor date, masa rădăcinilor plantulelor haploide în medie la diferite faze de dezvoltare constituie 10-60% din cea a diploizilor, astfel acest indiciu servind ca factor suplimentar la identificarea haploizilor [12]. Genele de inhibiție a antocianului adesea pun în dificultate manifestarea caracterului, din care motiv este necesară elaborarea altor metode de evidențiere a haploizilor ce nu ar depinde de prezența inhibitorilor antociani. Sub acest aspect, o metodă destul de interesantă a fost elaborată în Germania [109]. În calitate de marker s-a utilizat rezistența trans-genică pentru erbicidul BASTA. Paternul de moștenire a rezistenței este dominanța monogenică, iar genotipurile rezistente pot fi selectate la faza de plantă tânără. Plantulele haploide pot fi identificate în baza arsurilor pe fragmentele de frunză, ca reacție la soluția de erbicid de 1%. Totuși, metoda propusă nu prezintă exactitate la apreciere, motiv pentru care plantulele selectate urmează a fi suplimentar testate în condiții de câmp, sau analizate citologic.

Anumite progrese la crearea sistemului marker au fost determinate de utilizarea genelor embrionare, care se manifestă la faza de boabe mature și permit evidențierea haploizilor cu embrion haploid. Aplicarea acestora este foarte rentabilă, deoarece selectarea haploizilor nu are restricție de timp, materialul poate fi păstrat, înșământat în câmp sau seră în perioada necesară.

Autorii K. Sarkar, E. Coe (1966) au folosit ca component matern, genotipuri ce dețin în stare homozigotă gena *Cl* (colorație antocianică în stratul aleuronic). Componentul patern al încrucișării conține gena *Cl-1* în stare homozigotă, care inhibă sinteza antocianului. La boabele hibride ce conțin markerii polenizatorului, din cauza blocării sintezei antocianului nu este prezentă colorația, iar cele cu aleuronă pigmentată se selectează ca presupuși haploizi. Determinarea finală a nivelului de ploidie se realizează în condiții de câmp. Plantele considerate haploide în baza fenotipului, se deosebesc ușor de plantele diploide, ceea ce relevă eficiența markerilor *Cl* și *Cl-1*, utilizarea acestui sistem făcând posibilă selectarea haploizilor cu precizie înaltă [214]. Totuși aplicarea acestor markeri la identificarea haploizilor materni are și unele dezavantaje, întrucât pot fi utilizați la obținerea haploizilor doar din materialul care conține în stare homozigotă gena *Cl*, complementară genelor ce controlează sinteza antocianului. De asemenea, este necesar ca componentul patern al încrucișării să conțină gena *Cl-1* care inhibă sinteza pigmentului.

În comparație cu sistemul sus-menționat, mai performant este sistemul ce conține gena *R1-nj*, identificată pentru prima dată de Brink, citologic confirmată de S. Chase. *R1-nj* determină colorația antocianică în stratul aleuronic al endospermului. Pentru expresia acestei gene, este necesară prezența tuturor genelor, care controlează sinteza antocianului – *A1*, *A2*, *bz1*, *Bz2*, *Cl*, *C2* [77]. În baza cercetărilor autorilor D. Nanda, S. Chase (1966), I. Greenblatt, M. Bock (1967) au creat sistemul marker cu utilizarea genei *R1-nj* (*R-novaho*). De rând cu gena *R1-nj*, în sistem mai sunt prezente genele *b1*; *pl1*; *A1*; *A2*; *A3*; *Cl*; *C2*; *pr1*; *P1-wr*. Astfel, cercetătorii D. Nanda, S. Chase au utilizat acest sistem pentru identificarea haploizilor induși de linia inductor W22, iar I. Greenblat, B. Bock – de linia W23. Utilizarea genei *R1-nj* permite selectarea haploizilor în baza boabelor cu embrion nepigmentat și strat aleuronic pigmentat [118, 183].

Sistemul marker ce conține gena embrionară *R1-nj* prezintă un mare avantaj în raport cu sistemele menționate anterior. Utilizarea acesteia permite identificarea exactă a haploizilor la faza de boabe mature, fără eforturi fizice și cheltuieli financiare semnificative. Totuși, există un dezavantaj al utilizării markerului *R1-nj* în caz dacă genotipul matern conține genele *Cl-1*, *C2-Idf* și *In1-d*: pigmentația antocianică variază în intensitate, din care motiv haploizii adesea sunt selectați incorect [110], ceea ce demonstrează influența sursei donatoare asupra expresiei acestei

gene [89]. Date similare cu privire la influența donorului asupra expresiei diferitelor gene au fost obținute de E. Partas și colaboratorii săi [6].

În general, se poate concluziona că genele marker descrise au permis obținerea și identificarea haploizilor pentru un număr destul de mare de genotipuri la porumb, iar miza pe obținerea spontană a haploizilor, timp îndelungat a determinat reținerea utilizării acestora în scopuri practice.

1.3. Modalități de majorare a frecvenței haploizilor

Odată cu obținerea spontană a haploizilor la porumb, rata cărora constituie circa 0,1%, o mare parte din cercetările în domeniul haploidiei au fost axate pe elaborarea diferitelor metode de majorare a frecvenței acestora. Autorul Randolph (1938) a comunicat despre reușita majorării de 2,5 ori a frecvenței haploizilor, prin tratarea polenului cu raze X. Astfel, s-a constatat că din 24650 de boabe tratate, 61 aveau embrion haploid, frecvența haploizilor constituind 0,25% [198]. L. Stadler (1940) studiind influența razelor X și UV (ultraviolete) asupra frecvenței haploizilor obținuți, a constatat creșterea în descendență a numărului de haploizi. Rata de haploizi obținuți la tratarea polenului cu raze UV s-a dovedit a fi mai ridicată, decât la tratarea polenului cu raze X. Ambii autori însă au recunoscut, că rezultatele obținute de dâșii reprezintă totuși un artefact, acesta datorându-se mai curând reprimării viabilității și productivității plantelor, decât majorării numărului autentic al haploizilor [225].

S-a demonstrat că iradierea cu raze X, sau UV poate fi eficientă și pentru alte specii. Spre exemplu, Y. Katayama (1934) studiind inducerea haploizilor prin iradierea polenului la *Triticum monococcum* a obținut 16 haploizi din 91 plante, ceea ce prezintă 17,6%. Polenizarea ulterioară a pistilurilor iradiate cu polen normal, nu a condus la obținerea plantelor diploide normale [142].

Ca posibilă modalitate de majorare a frecvenței haploizilor s-a testat reținerea termenului de polenizare. În această direcție, R. Seaney (1954) a obținut rezultate destul de interesante. Hibridul *B8 x oh51A* a fost polenizat cu o întârziere de la 4 la 20 zile. Numărul de plantule cercetate provenite de la diferite variante a variat în limitele 6366-31296. S-a constatat, că întârzierea polenizării într-adevăr duce la majorarea numărului de haploizi. Cel mai eficient procedeu s-a dovedit a fi întârzierea polenizării cu până la 20 de zile, prin care s-au obținut 22 haploizi, randamentul constituind 0,35%, în timp ce întârzierea polenizării cu 4 zile a permis obținerea unei frecvențe a haploizilor de 0,044%. Totuși, precum menționează autorul, din cauza condițiilor de mediu întârzierea polenizării cu 20 zile deseori duce la pierderea totală a viabilității mătasei și sacilor embrionari. În unele condiții, chiar și întârzierea cu o săptămână

poate crea repercursiuni nedorite, motiv pentru care metoda menționată nu a avut o aplicabilitate largă în genetică și ameliorare [218].

Autorii L. Mazoti, C. Muhlenberg (1958) au sugerat ca modalitate de mărire a randamentului haploizilor la porumb – strategia mizată pe acțiunea alocitoplasmei. În acest scop s-au creat două linii diferite din punct de vedere citoplasmatic: porumb și Teosinte, ambele conținând genele *al*, *bl*, *Cl*, *rl*, *pll*, *gll*, *igl*. În calitate de polenizator a servit o a treia linie cu genele marker *Al*, *Bl*, *c1*, *R1*, *pl1*, *G11*, *Ig1*. Acțiunea citoplasmei Teosinte s-a dovedit a fi destul de semnificativă, deoarece a indus din 2347 de plante 16 haploizi, adică 0,68%, în timp ce în descendența liniei cu citoplasmă normală s-au obținut doar 0,27% haploizi. Totuși, în baza acestor rezultate a fost dificil de elaborat concluzii definitive, cu privire la influența alocitoplasmatică asupra inducerii haploizilor la porumb [174].

În a.1952 L. Ford a comunicat, că selecția recurentă a componentului matern al încrucișării poate spori inducerea haploizilor. El a reușit să obțină haploizi cu o frecvență de 0,3% în descendența liniei haploide W23, ceea ce a condus la concluzia importantă că frecvența de inducere a haploizilor este determinată genetic și poate fi majorată sau micșorată (reglată) în procesul selecției [102], aceste predicții confirmându-se pe parcursul cercetărilor ulterioare.

1.4. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor

O nouă etapă în domeniul haploidiei a fost marcată de crearea liniilor cu capacitate de inducere a diferitelor tipuri de haploizi. Odată cu obținerea inductorilor, frecvența plantelor haploide s-a majorat considerabil.

1.4.1. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor materni

Crearea inductorilor de haploizi materni la porumb, a început odată cu cercetările conduse de E. Coe [85]. În anii '50 ai sec. XX, compania Northrup King Seed Company deținea o sursă de porumb mexican tardiv, cu utilizare în alimentație și caracteristici genetice unice: știulete cu guler roșu, boabe de tip sticlos, violete, purpurii, cu embrion alb făinos.

Întrucât linia era puțin utilizată în practică, ea a servit inițial ca material de cercetare, ulterior fiind transmisă lui E. Coe de către Dr. Burnman. Mai întâi materialul a fost supus cercetării pigmentilor antocianici. În raportul „*Linii de porumb cu frecvență haploidă înaltă*”, E. Coe (1959) a comunicat despre depistarea liniei Stock 6 din acest material, care are un potențial de inducere a haploizilor materni de 2-3% [85]. Cercetările ulterioare, de asemenea au demonstrat, că polenul liniei Stock 6 are capacitate relativ înaltă de inducere a haploizilor [51].

Linia conține genele *Al*, *Cl*, *Rgl*, *Pr1*, *bl*, *pl1*, iar genele marker – *R1-nj*, *B1*, *Pl1* care se utilizează în procesul identificării haploizilor, la această linie lipsesc. De aceea pentru identificarea haploizilor, E. Coe a utilizat ca component matern al încrucișării gena marker recesivă *gll*, care determină caracterul lucios al frunzelor la etapa de 3-5 frunze. Mai târziu, gena *R1-nj* a fost introdusă în sistemul liniei Stock 6 și a servit plenar ca linie inductoare [67, 68]. Actualmente, la "Maize Genetics Cooperation Stock Center", USDA-ARS linia poate fi obținută cu denumirea de M741H. Este important de menționat, că linia Stock 6 a servit ca material inițial pentru majoritatea inductorilor creați ulterior în diverse instituții și centre de ameliorare a porumbului (Tabelul 1.1).

Tabelul 1.1. Inductori utilizați la obținerea haploizilor materni

Inductori	Capacitate de inducere a haploizilor, %	Referințe
Stock 6	2 – 3	Coe, 1959
WS 14	2 – 5	Lasherms, 1988
ЗМС, КМС	1 – 4	Тырнов, Завалишина, 1984
KEMS	~6	Shatskaya et al., 1994
PEM 18	~0,5	Забирова, 1996
MHI	6 – 8	Chalyk, 1999
CAUHOI 1	5 – 6	Liu et al., 2000a
ЗМК1, ЗМК2	6 – 8	Shatskaya, 2001
RWS	8 – 10	Röber et al., 2005
UH400	>8	Melchinger et al., 2005
PK6	~6	Barret et al., 2008
HZI 1	~10	Zhang et al., 2008
TAILs	8 – 12	Prasana et al., 2012

Un pas decisiv în dezvoltarea tehnologiei haploidiei l-a constituit crearea inductorilor ЗМС (*Зародышевый Маркер Саратовский*) și КМС (*Коричневый Маркер Саратовский*) la Universitatea de Stat din Saratov, Federația Rusă [22]. Inductorii au capacitatea de inducere a haploizilor materni cu frecvența de 0,55-3,43%, și 0,75-2,94, respectiv. Genele marker ale liniei ЗМС – *Al*, *Cl* și *R1-nj* determină pigmentarea endospermului și embrionului, ceea ce face posibilă identificarea haploizilor la etapa de boabe uscate. Linia ЗМС a servit de asemenea, ca

genitor la obținerea altor noi inductori genetici eficienți. Liniile noi – 3MK1, 3MK2 induc haploizi cu frecvență de 6-8% și chiar 13% [30, 31, 221].

În baza liniilor 3MC și KMC, la Institutul de Genetică (actualmente – IGFPP al AȘM) a fost creat inductorul MHI (*Moldavian Haploid Inducer*) cu capacitatea de inducere a haploizilor de 6-8% [27, 63]. Sistemul marker al inductorului a devenit mai stabil datorită prezenței genelor *PI1* și *RI-nj*, care permit selectarea exactă la nivel de plante mature și boabe uscate, din genotipurile ce nu conțin gene inhibitoare ale antocianului, deci cu expresie fenotipică a pigmentului.

Câțiva ani mai târziu, în Germania a fost creată linia de inducere a haploizilor materni – RWS, care provine din combinarea a două linii: WS14 – de origine franceză și KEMS – de origine rusă [202]. Pentru obținerea acesteia, combinația hibridă a fost autopolenizată timp de cinci generații. Randamentul liniei variază în limitele 8-10%, iar boabele cu embrion haploid sunt selectate în baza expresiei genei *RI-nj*. De asemenea, în Germania autorul H. Geiger a comunicat despre crearea unui nou inductor UH 400 obținut în baza liniei KEMS, cu capacitate de inducere a haploizilor de peste 10% [175]. În China, la Universitatea Agricolă a fost creat inductorul 1 CAUHOI (*China Agricultural University*), prin combinarea liniei Stock 6 și BHO (*Beijing High Oil Population*) cu randament de inducere de 5-6% [165]. În cadrul centrului CIMMYT-Mexic, în colaborare cu Universitatea Hohenheim (Germania) s-a propus testarea inductorilor RWS, UH400 în regiunile cu climă temperată și a hibridului RWS×UH400 - în condiții tropicale și subtropicale. Potențialul de inducere a haploizilor de către inductori, în condiții temperate variază în limitele 8-10%, iar rezultatele inducerii haploizilor în condiții tropicale și subtropicale nu s-au înregistrat diferențe considerabile de valori. Totodată, inductorii posedă caractere agronomice slab ameliorate (înălțimea plantei, cantitatea de polen, durata înfloririi paniculului) și adaptare slabă la condițiile tropicale [194] (Figura 1.2).



Fig. 1.2. Inductori creați în condiții temperate și cultivați în condiții de climă tropicală pe câmpul experimental CIMMYT, Mexic [194].

În comparație cu inductorii sus-menționați, linia TAILs pentru condițiile tropicale prezintă un randament de 8-12%, se evidențiază prin caractere agronomice mai ameliorate, inclusiv pentru rezistență la diferite boli și dăunători. Talia înaltă a plantei inductor permite obținerea eficientă a haploizilor pe parcele izolate, polenizarea artificială fiind înlocuită cu succes cu cea naturală [194].

1.4.2. Crearea liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor androgeni

La diferite culturi inclusiv porumb, paralel cu haploizii materni se obțin și haploizi androgeni [218, 114], aceștea atestându-se cu frecvență mult mai mică. Autorul R. Seaney (1954), a identificat 4 haploizi într-o populație de 750.000 de plantule, adică 1/187.500, iar S. Goodsell (1961) a constatat, că haploizii androgeni se obțin spontan cu frecvență de 1/80.000 plante, fiind primul care i-a folosit pentru transferarea liniei de selecție la nivel de sterilitate citoplasmatică. Pentru aceasta, s-a polenizat o sursă cu citoplasmă sterilă de tipul T cu polenul liniei N6, iar în plantele hibride au fost identificați haploizi care fiind polenizați cu linia N6, au generat un analog steril al liniei N6 cu citoplasmă de tipul T [114].

Un analog steril al liniei homozigote s-a obținut prin metodă de androgeneză. Pentru aceasta, s-au utilizat o sursă tetraploidă de citoplasmă sterilă de tipul T, care conține gena *lg1*, iar în calitate de component patern – linia H52. În descendența $4n^T \times 2n$ a fost identificată o plantă diploidă, parțial fertilă care fenotipic seamăna cu linia paternă H52. Ca rezultat al autopolenizării în descendența plantei s-au format, atât plante sterile, cât și parțial fertile. Totuși, precum s-a concluzionat, metoda nu prezintă eficacitate suficientă pentru utilizare largă în ameliorare [75].

Autorul С. Чалык (1966), a obținut un analog steril al liniei menționate în baza utilizării haploizilor androgeni obținuți prin încrucișări $2n \times 2n$. În calitate de component matern al încrucișării a servit markerul Chase, iar ca component patern al încrucișării - linia AP 382-7-1-1. Din 24000 de plantule hibride a fost evidențiată doar una, care datorită particularităților fenotipice și expresiei genelor antocianice s-a dovedit a fi un haploid androgen, fapt confirmat prin teste citologice. În timpul înfloririi planta haploidă a prezentat sterilitate masculină. După polenizarea cu polen de la linia AP 382-7-1-1, s-a obținut un analog steril al acestei linii care a păstrat sterilitatea și în generațiile următoare, iar fenotipic nu se deosebea de linia AP 382-7-1-1 [25].

Actualmente, haploizii androgeni se obțin în număr mare, pentru prima dată fenomenul fiind menționat de J. Kermikle (1969). S-a stabilit, că polenizarea plantelor care dețin gena

homozigotă recesivă *igl* dezvoltă de la 1 la 3% haploizi androgeni [146, 217]. Gena *igl* controlează numărul de diviziuni mitotice la formarea gametofitului, care în mod normal sunt în număr de trei [162, 163]. O segmentare suplimentară a nucleului din sacul embrionar, duce la dezvoltarea mai multor ovule și la apariția poliembrionilor – bob cu doi sau mai mulți embrioni. Segmentarea suplimentară a ovulului poate determina pierderea capacității de fertilizare și de dezvoltare a embrionului diploid. Uneori însă, embrionul se poate dezvolta din spermii. Inițierea dezvoltării endospermului stimulează dezvoltarea embrionului din nucleul spermatic și citoplasma ovulului.

Analizele citologice ale sacilor embrionari la plantele homozigote conform genei *igl* au demonstrat o rată înaltă de dereglări (55-99%) ale dezvoltării gametofitului. S-a presupus că în sacii embrionari, după prima diviziune mitotică se formează vacuole mari centrale, iar nucleul din sacul embrionar localizat neobișnuit provoacă mărirea indicelui mitotic [13, 99].

În baza genelor *igl* și *RI-nj* au fost creați inductori androgeni, transferați la diferite tipuri de sterilitate citoplasmatică. Aceștia permit obținerea liniilor analoage cu sterilitate masculină în două generații. Utilizarea metodelor tradiționale de transformare în linii cu sterilitate masculină citoplasmatică necesită 5-6 retroîncrucișări [82, 83].

Cu toate acestea, utilizarea inductorilor androgeni este restrânsă, din care motiv implementarea lor în practică este anevoioasă. Plantele homozigote pentru gena *igl* cu sterilitate masculină se multiplică prin încrucișarea $igl\ igl \times Igl\ igl$. S-a constatat, că doar 50% din descendenții acestor încrucișări, pot fi utilizați la obținerea plantelor haploide androgene. Pentru mărirea ratei haploizilor androgeni cu genotipul *igl igl* s-a aplicat următoarea schemă: în genotipul liniei W23 cu gena *igl* s-a introdus translocația B-A ce conține un segment de cromozom A cu gena *igl* [148]. Polenul trisomiei $3(ig)\ 3(ig)\ B-3Ld(Ig)$ create s-a dovedit a fi fertil și a fost implicat în încrucișare cu genotipul *igl igl*. Prin polen se transmit aproximativ 2% din cromozomul cu translocația B-3Ld. Circa 98% polen al trisomiei deține gena *igl* care mărește semnificativ frecvența plantelor cu capacitate de inducere a haploizilor androgeni, astfel rata plantelor haploide majorându-se până la 8% [149, 150].

Au fost create trisomii ce conțin translocația B-3Ld și posedă următoarele tipuri de sterilitate citoplasmatică: C, S, SD, VG, ME, MY, CA, L, Q [150], care permit transferarea rapidă a liniilor de selecție la oricare din tipurile de citoplasmă menționate. Încercarea utilizării acestora în procesul de selecție a demonstrat, însă că frecvența inducerii haploizilor androgeni constituie doar 0,041%, din care motiv utilizarea pe scară largă a trisomiilor $3(ig)$, $3(ig)$, $B-3Ld(Ig)$ în selecție este restrânsă [32, 222].

Haploizii androclini se obțin *in vitro* din cultura de polen și antere în condiții specifice, în număr destul de mare și posedă toate caracteristicile genetice moștenite de la linia paternă donatoare [19, 41, 58, 100, 112, 117, 119, 128, 177, 186]. Conform datelor, este posibilă obținerea unui număr mare de linii dublu haploide din cultura de antere de porumb, la care dublarea spontană a cromozomilor poate avea loc cu frecvență înaltă [240, 255]. Chiar dacă în principiu, s-a reușit obținerea haploizilor și liniilor DH din cultura de antere, această direcție necesită totuși o continuă optimizare, deoarece capacitatea de regenerare a multor genotipuri în condiții *in vitro* prezintă un impediment serios pentru obținerea liniilor homozigote [130, 177, 188]. S-a constatat, că liniile DH dezvoltate din cultura de antere demontrează un nivel înalt de instabilitate [179, 180], din care motiv sunt necesare surse financiare considerabile ce depășesc cu mult cheltuielile pentru metodele tradiționale de selecție [189].

1.5. Controlul genetic al capacității de inducere a haploizilor materni

Primele încercări de stabilire a controlului genetic al capacității de inducere a haploidiei la porumb au fost efectuate la linia Stock 6, care au demonstrat moștenirea recesivă a caracterului. De rând cu aceasta, analiza populației segregante provenite din încrucișarea inductorului Stock 6 cu linia 2698, a condus la supoziția că capacitatea de inducere este controlată de doi factori genetici [85].

Autorii K. Sarkar, E. Coe (1966) au realizat cercetări minuțioase ale capacității de inducere a liniei Stock 6, pentru determinarea exactă a numărului de gene, ce controlează caracterul. S-a stabilit, că la utilizarea polenului liniei Stock 6 pe unii știuleți se formează până la 10% haploizi. Localizarea boabelor haploide s-a dovedit a fi mai evidentă în părțile terminale ale știuletelui, frecvența acestora înregistrând valori de 2-4% și 7-8%, respectiv, ambelor capete. Localizarea diferită a boabelor haploide pe știulete demonstrează faptul, că inducerea haploizilor este controlată de doi factori genetici independenți. Datele, însă, au fost tratate cu prudență, propunându-se totuși efectuarea selectărilor în linia Stok 6 ca oportunitate sigură de majorare a ratei haploizilor [214].

Încercări de a stabili natura capacității de inducere a haploizilor materni la linia Stock 6 au fost realizate de P. Lashermes, A. Gailard, M. Beckert (1988), care au constatat că inducerea haploizilor este un caracter cu moștenire recesivă. Concluzia de bază a acestor cercetări este, că caracterul dat la linia Stock 6 este controlat de un număr limitat de gene [157]. Conform unor date, capacitatea polenizatorului de inducere înaltă se moștenește ca caracter poligenic și este

transmis prin polen și ovul. Această moștenire specială poate fi utilizată la crearea noilor inductori, cu capacitate inductivă înaltă [17].

În cadrul cercetărilor în vederea stabilirii mecanismelor de formare a haploizilor materni, prin analize citologice ale polenului inductorului, s-a constatat că acesta posedă trei nuclei [156], iar endospermul boabelor haploide este triploid [76, 214].

Până în prezent, mecanismul de inducere a haploizilor materni la porumb este destul de incert, cu toate că cercetări în domeniu se fac în multe instituții de profil din diferite țări.

Investigații în acest sens au fost realizate și la Universitatea de Stat din Saratov [98, 99]. Prin cercetarea polenului liniei inductor PEMS-2 (*Purple Embryonic Marker Saratovsky*) și sacilor embrionari după polenizare, s-a constatat că polenul acestei linii se dezvoltă normal și pătrunde în sacul embrionar, însă în unele cazuri are loc dezvoltarea doar a endospermului, sau a embrionului. Acest fenomen a fost numit de autori, fecundare singulară (*engleză*), întrucât se fecundează fie ovulul, fie nucleul central al sacului embrionar, spre deosebire de fecundarea dublă în care are loc contopirea spermilor cu ovulul formând embrionul ($2n$) și cu nucleul central, din care rezultă endospermul ($3n$). De regulă, dezvoltarea endospermului triploid stimulează segmentarea ovulului haploid nefecundat, iar în cazul când ovulul nu este apt de a se dezvolta de sine stătător, se obțin boabe fără embrion.

În prezent sunt propuse două ipoteze pentru mecanismul de inducere a haploizilor materni:

(1) Unul din spermii inductorului este defectuos, dar încă capabil să fecundeze ovulul. Ulterior, în timpul dividerii celulelor, cromozomii paterni degenerază și treptat sunt eliminați din celulele primordiale. Al doilea spermii, fecundează celula centrală, din care se dezvoltă endospermul normal triploid [140, 243, 251].

(2) Unul din spermii inductorului nu este apt de a fuziona cu ovulul, dar poate genera embriogeneza haploidă. Al doilea fuzionează cu celula centrală conform primei ipoteze [66, 98, 226].

Experimental, prima ipoteză a fost controlată de M. Wedzony și colab. (2002), care au fixat prin metode citologice ovare de la plante autopolenizate RWS în timpul primelor 20 zile după polenizare. În legătură cu capacitatea inductoare a liniei RWS, de menționat că 18 din 203 embrioni, conțineau micronuclei în fiecare celulă primordială. Micronucleii variau numeric și dimensional, prezentând caracteristici tipice cromatinei inactive din punct de vedere metabolic. În unele sectoare centrale, de asemenea, au fost observate fragmente de cromozomi. Eliminarea micronucleilor începe în timpul etapei globulare a embriogenezei [243].

Rezultatele sunt în contradicție cu datele obținute de F. Fisher (2004) și L. Li (2009), dar în ambele studii a fost detectată o mică fracțiune din genomul inductorului RWS în genomul haploizilor. Prin tehnici de markeri moleculari s-a constatat că 1,4% haploizi dețin fragmente de ADN ale liniei inductoare. La utilizarea inductorului CAUHOI, randamentul a constituit 43%, rata de ADN transmisă a constituit 1,8%. Paternul de moștenire a conținutului înalt de ulei al liniei inductoare s-a constatat în baza concentrației de ulei la haploizii care conțineau segmente de cromozom patern [101, 161].

Cercetările citologice ale polenului liniei 3MC, realizate la instalația automată „Морфоквант”, care include microscopul cu scanare color și un complex computerizat, au determinat că în unele grăuncioare de polen al liniei 3MC creșterea și maturizarea spermilor are loc cu viteză diferită [59]. Astfel, unul din spermii este matur și pregătit de fecundare, iar al doilea structural este nedevelopat și reprezintă o formațiune rotunjită de densitatea cromatinei, mai mică decât spermii dezvoltați normal. Același fenomen a fost depistat și la linia MHI, întrucât inductorul 3MC a constituit unul din părinții MHI [29]. Astfel, s-a constatat, prezența a două tipuri de grăuncioare de polen: 1) cu spermii care au același nivel de dezvoltare, 2) cu spermii ce se dezvoltă diferit (Figura 1.3).

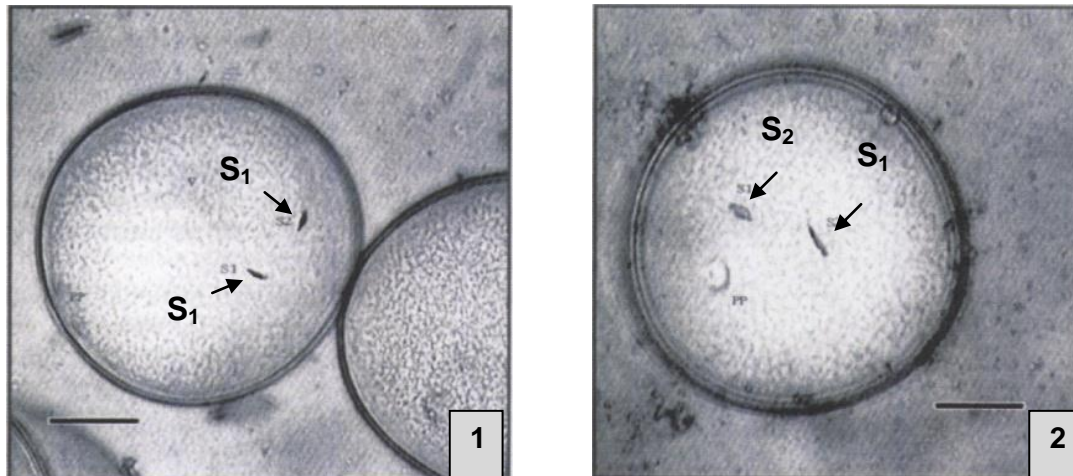


Fig. 1.3. Polenul liniei MHI: S₁ - spermii funcțional, normal; S₂ - spermii nedevelopat [29].

În ceea ce privește a doua ipoteză, aceasta nu a fost confirmată practic. Totuși se admite, că inductorii cu perturbări de reproducere, ca microsporocite aneuploide [66], sau heterofertilizare înaltă [153], pot avea abilitatea de a induce embriogeneza haploidă, fără

penetrarea ovulului de către nucleii spermatici. Numeroase cercetări au demonstrat faptul că inducerea haploizilor este controlată poligenic [91, 157].

La utilizarea diferitelor genotipuri de porumb în calitate de donori și liniei inductoare *PK6* ca polenizator, s-a detectat un locus al cromozomului 1 ce influențează inducerea haploizilor, alelele acestui locus influențând semnificativ rata de inducere în mai multe combinații [47].

Autorul V. Prigge (2012) a realizat cartografierea comparativă a QTL (*Quantitative Trait Loci*) la patru populații segregante, obținute ca rezultat al încrucișării inductorului UH 400 cu două linii din condiții temperate: CAUHOI, 1680 și două – tropicale: CML395, CML495. La trei populații, locus-ul major din cromozomul 1 (bin 1.04) controlează inducerea haploizilor și determină până la 66% din varianța genetică. În populația segregantă obținută, ca rezultat al încrucișării a doi inductori CAUHOI × UH400, s-au identificat 7 QTL în 5 cromozomi și 1 QTL responsabil de inducerea genotipurilor haploide în cromozomul 9, rezultatele sugerând existența unui QTL major în cromozomul 1 și a mai multor QTL minori, care ulterior vor fi explorați în vederea sporirii eficienței de inducere [195].

Destul de frecvent, cercetătorii în lucrul cu haploizii observă plante cu fenotip neobișnuit, care nu prezintă similitudini autentice cu haploizii, sau hibridii, dar manifestă expresia genelor marker dominante ale polenizatorului. De regulă, aceste plante se dezvoltă anevoios, sunt mai tardive și deseori sterile, frecvența acestora fiind totuși destul de redusă: $\leq 1\%$. Analizele citologice la nivel de sistem radicular, au demonstrat că aceste plante sunt aneuploide. Dacă originea haploizilor materni stă la baza încrucișării donorului cu inductorul, atunci ca sursă a aneuploizilor sunt doar formele inductoare. Astfel, este posibil că unele grăuncioare de polen ale acestora să conțină spermii cu garnitură aneuploidă de cromozomi.

Pentru a explica acest fenomen, S. Chalyk și colab. (2003) au cercetat numărul de cromozomi în microsporocite la două linii de inducere a haploizilor – MHI și M471H, în timpul meiozei, la faza de diachineză. Materialul a fost testat atât în condiții de câmp, cât și de seră. S-a constatat, că frecvența aneuploizilor este mai mare în cazul cultivării materialului în condiții de seră. Comparativ cu linia M471H, la linia MHI frecvența aneuploizilor a fost mai înaltă, constituind 14,7%. În ceea ce privește frecvența diferitelor tipuri de bivalenți s-a demonstrat, că cele mai înalte valori au înregistrat celulele cu 11 bivalenți, după care au urmat celulele cu 9 bivalenți. Cea mai mică frecvență s-a constatat pentru celulele cu 8 și 12 bivalenți. La liniile obișnuite de porumb, frecvența aneuploizilor este foarte mică, variind în limitele 0,5-1,5%. Faptul că frecvența aneuploizilor este mult mai înaltă la inductori și că de rând cu haploizii apar

aneuploizi, face valabilă supoziția, că inductorii produc spermii aneuploizi care pot dereglă fecundarea dublă, fenomen ce stimulează dezvoltarea ovulului în lipsa fertilizării [66].

Astfel, se poate menționa că de la apariția primei linii inductor până în prezent, progresele obținute în cercetarea și dezvoltarea inducerii haploizilor a favorizat implicarea și utilizarea în masă a haploizilor, atât în ameliorare, cât și cercetări fundamentale [202].

1.6. Avantaje și perspective la utilizarea plantelor haploide și dublu haploide (DH)

Faptul că haploizii pot fi obținuți într-un număr mare la multe specii de plante, a determinat interesul pentru utilizarea acestora în soluționarea multor probleme ale geneticii, citogeneticii și ameliorării [113, 132, 133, 201].

Homoziția și segregarea gametică. Plantele haploide demonstrează homoziție genetică deja într-o singură generație, deoarece dețin doar câte o alelă a fiecărei gene. Fenomenul de expresie a tuturor genelor, atât dominante cât și recesive este propunțat, din care motiv caracterele ușor se supun selecției naturale. Dat fiind faptul, că la plantele haploide lipsește fenomenul de dominanță sau supradominanță, există posibilitatea înlăturării genelor nocive, letale și subletale recesive și ameliorarea genetică cu gene noi de interes. Cu alte cuvinte, plantele haploide servesc ca filtru genetic de purificare a populațiilor de gene indezirabile. Dublarea garniturii haploide purificate de aceste gene, prezintă baza genetică de creare a liniilor dublu haploide, iar homoziția completă - la nivel de 100% exclude posibilitatea de segregare în generațiile descendente [69].

În cercetările autorilor [26, 64], plantele haploide au fost utilizate la ameliorarea a două linii 092 și Rf7. S-a demonstrat, că plantele haploide pot servi ca factor important pentru îmbunătățirea materialului inițial la porumb. Lipsa fenomenului de dominanță și supradominanță, facilitează selectarea genotipurilor cu gene favorabile. Plantele haploide permit evidențierea oligogenelor particulare care controlează așa caractere valoroase, ca productivitatea, capacitatea înaltă de supraviețuire și rezistența la diferiți factori nefavorabili.

Un avantaj al utilizării plantelor haploide în genetică și ameliorare prezintă particularitățile de segregare a genelor. Haploizii materni sunt rezultatul dezvoltării embrionului dintr-un ovul nefecundat. Deci, segregarea în cadrul haploizilor corespunde segregării gametice, utilizarea căreia a fost descrisă detaliat de către M. Nei (1963). Autorul a demonstrat, că numărul de combinații gametice în rezultatul autopolenizării F_1 se determină în baza formulei 4^n , în care n – numărul de gene conform cărora are loc segregarea. În generația F_2 se formează 4^n variante de plante, deoarece fiecare clasă genetică de segregare va fi prezentată cel puțin o singură dată.

Pentru plantele haploide obținute din F_1 , ca și pentru gameți formula de segregare este alta – 2^n . Cu alte cuvinte, combinațiile dorite de gene pot fi întâlnite cu probabilitate mai mare printre plantele haploide, decât diploide. Aceasta prezintă, un mare avantaj în programele de ameliorare a caracterelor calitative agronomice valoroase [185].

Utilizarea plantelor haploide în citogenetică și genetică. Haploizii sunt cu succes utilizați în diferite analize genetice, citogenetice, deoarece fiecare genă este prezentată doar de o singură alelă. Astfel, impediamentele legate de prezența alelei omoloage la stabilirea cariotipului sunt excluse, ceea ce permite o analiză mai exactă a setului de cromozomi [129, 132, 137, 172, 228]. Studiile citogenetice ale haploizilor la speciile poliploide au contribuit la elucidarea comportamentului cromozomilor în timpul asocierii diferitelor componente genomice, sau împerecherii cromozomilor, cu toate că originea autentică a asocierii cromozomilor omologi este la moment incertă [52, 53, 134, 135].

Cercetările haploizilor a contribuit enorm la înțelegerea structurii genetice, citogenetice și evoluției multor specii de plante. Sporofitul plantelor haploide oferă oportunități unice în cercetarea expresiei alelelor și efectelor dozelor de gene asupra fiziologiei și morfogenezei acestora [134].

Deținerea doar a unui cromozom omolog de către haploizi, prezintă un material valoros la cercetarea mutațiilor, deoarece este destul de simplă estimarea frecvenței mutațiilor spontane pentru un locus specific. Existența genelor cu efect nociv în orice populație, linie sau hibrid, este un fenomen natural, o expresie a manifestării proceselor mutaționale. În condiții naturale, între aceste gene și cele favorabile există un anumit echilibru. Totuși, genele cu efect nefavorabil treptat sunt eliminate din populație și înlocuite cu altele noi. Haploizii servesc de asemenea, ca material de cercetare a influenței citoplasmei străine asupra exprimării caracterelor calitative și cantitative, la cartografierea genetică a caracterelor complexe, fenomenului de transgeneză și în diverse domenii ale genomicii [104].

Analiza genetică a rezistenței liniei mexicane de ardei CM 334 la virusul *PVY* în baza segregării liniilor DH a demonstrat implicarea a două două gene, una – dominantă ce controlează rezistența la toate tipurile cunoscute de virusuri *PVY* și *PeMV*, iar a doua – recesivă, doar pentru un tip de virus *PVY* [94]. O etapă importantă în stabilirea bazei genetice a caracterelor calitative la porumb a fost realizată prin utilizarea în cercetări a plantelor haploide și nu a liniilor DH. Asemenea strategie a facilitat în mare măsură analiza genetică, ceea ce a rezultat cu evidențierea a câtorva oligogene cu acțiune puternică asupra caracterelor agronomice valoroase. Totodată, s-a

constatat existența interacțiunilor genelor de interes, precum și variabilitatea efectului acestora în diferite condiții de mediu [26, 64].

În prezent, liniile DH sunt utilizate la construirea hărților moleculare ale caracterelor genetice de importanță agricolă, cum ar fi rezistența la boli, dimensiunile plantelor, productivitatea. Construirea hărților genetice este mult mai eficientă, utilizând linii DH derivate din hibridii a doi părinți homozigoți. Ca rezultat, au fost create hărți genetice la așa culturi ca orz, orez, grâu, rapiță, ardei și s.a [105].

Liniile DH servesc ca material de cercetare a caracterelor calitative și cantitative controlate de QTL, pentru construirea hărților genetice care au aplicare largă în genetica cantitativă – fundamentală și aplicată [81, 191, 245].

Exemplele de utilizare a liniilor DH în cartografia QTL la culturile cerealiere, includ studii ale diverselor enzime la porumb [39]; rezistenței orzului la fungul *Fusarium flagel* [171]; înălțimii plantei la orez [116, 155, 168]; înălțimii plantelor, culorii făinii, rezistenței grâului la *Septoria tritici* [81, 203, 250, 251, 252]; liniilor de rapiță cu conținut înalt de fitosteroli [36] și de acid erucic [184], înălțimii plantelor și însușirilor generale de productivitate [80, 223]. La cultura de tutun cercetarea QTL a fost efectuată cu scopul identificării unui segment de cromozom marcat de gena *PHP* ce controlează rezistența la nematozii cu chisturi *Werres nicotianae* [136].

La cercetarea susceptibilității ardeiului la *Phytophthora capsei*, s-a constatat că din hibridul F₁ provenit din formele rezistente, s-au obținut 94 de linii DH. Pentru determinarea QTL s-au utilizat 119 markeri ADN. Spectrul QTL a fost destul de variat – de la QTL ce determină varianță fenotipică de 41-46 %, la QTL ce controlează 17-28% din manifestarea fenotipică și QTL cu efect minor. Cu ajutorul acestei linii s-a constatat că rezistența ardeiului la *Phytophthora capsei* este controlată atât de interacțiuni epistatice cât și de acțiuni aditive [160].

Localizarea QTL permite depistarea regiunii cromozomiale sau cromozomului integral cu rol important în controlul genetic al caracterului. Faptul că la unele și aceleași combinații în diferite condiții de mediu se atestă diferiți QTL pentru unul și același caracter, este o dovadă a expresiei diferențiate a QTL sub influența factorilor ambientali. La utilizarea a 2 linii DH provenite din 2 soiuri de *Brassica napus* pentru cartarea genelor ce controlează reacția la ciuperca *Leptosphaeria maculans*, s-a constatat, că ambele genotipuri dețin o genă principală, responsabilă de caracterul de rezistență. În afară de aceasta, s-au depistat markeri moleculari care fiind asociați cu gena rezistenței, pot fi utilizați în procesul ameliorării rezistenței soiurilor [173].

Prin utilizarea dublu haploizilor androgeni de orez în scopul identificării QTL responsabili de anumite caractere, s-a construit harta moleculară genetică în baza markerilor

RFLP. De menționat, că testările efectuate în trei condiții diferite de mediu, pentru determinarea interacțiunii *genotip x mediu*, au demonstrat existența a 6 caractere agronomice determinate de expresia a 22 QTL în una din condițiile de mediu și de doar 7 QTL - în toate trei condiții, ceea ce denotă existența QTL specifici și nespecifici pentru calitatea spicelor și calitatea boabelor. QTL implicați în controlul acestora au fost identici în toate trei condiții de mediu. Astfel, s-a constatat rolul condițiilor ambientale în expresia locusurilor majore, nivelul de interacțiune *QTL x mediu* fiind specific caracterului [167].

1.6.1. Dublarea garniturii de cromozomi la plantele haploide

Actualmente, plantele haploide au cea mai largă utilizare în ameliorarea diferitelor culturi prin posibilitatea de creare a liniilor dublu haploide. Elaborarea metodelor de dublare a cromozomilor la plantele haploide au demarat odată cu depistarea primilor haploizi, garnitura cromozomială a cărora s-a dublat spontan. Restaurarea spontană a fertilității masculine, vizibilă în baza capacității paniculului de a produce polen, variază în limitele 2,8-46,0% și este specifică genotipului, pe când cea a restaurării fertilității feminine evidentă prin numărul de boabe pe știulete, înregistrează valori de 25-94% [123, 165, 244].

Dublarea spontană a cromozomilor poate avea loc prin diferite mecanisme: fuziune celulară somatică, endoreduplicare, endomitoză, ș.a. Fuziunea celulară somatică, cunoscută de altfel ca fuziune de protoplaști are loc prin câteva etape: digestia peretelui celular sub acțiunea enzimelor celololitice; fuziunea nucleilor din cei doi protoplaști, cu formarea a unui singur; implicarea hormonilor de creștere la formarea unui nou perete pentru celula ce conține setul dublu de cromozomi [228].

Endoreduplicarea, cunoscută și cu denumirea de endomitoză poate avea loc în cazul distorsionării dividerii mitotice, caracterizându-se prin replicare dublă a ADN-ului în lipsa separării cromatidelor, dividerii celulare și citokinezei [216].

S. Chase (1963) a enunțat ideea, conform căreia necesitatea dubării numărului de cromozomi derivă din incidența diminuată a dublării spontane, fenomenul depinzând în mare măsură de genotip. S-a constatat că la anumite forme, rata dublării spontane este înaltă în fazele timpurii ale mitozei. Ca rezultat paniculul produce mai mult polen, iar în urma autopolenizării se dezvoltă boabe diploide normale. De asemenea, se cunosc forme la care dublarea spontană a cromozomilor decurge cu întârziere și destul de lent. Aceste genotipuri posedă capacitate diminuată de restaurare a fertilității. La plantele haploide obținute din asemenea material, dublarea spontană a numărului de cromozomi practic nu se produce spontan. Dacă genotipurile

ar poseda o frecvență a dublării spontane a cromozomilor mai mare de 20%, metodele artificiale practic nu ar fi necesare, acestea fiind utilizate doar pentru a mări rata haploizilor până la 50%. Spre regret, asemenea forme de porumb încă nu se cunosc, iar pentru o utilizare eficientă a haploizilor în genetică și ameliorare, cea mai indicată este dublarea artificială care asigură un randament mai înalt [48, 69]. Pe cale artificială, setul de cromozomi la plantele haploide poate fi dublat, atât *in vivo*, cât și *in vitro*, dublarea artificială *in vivo* fiind indusă de diferiți factori: chimici, genetici, etc [123].

Actualmente, din categoria factorilor chimici cel mai frecvent se utilizează colchicina – un alcaloid cu efect mutagen care se obține din semințe de *Colchicum autumnale* L. Alcaloidul acționează la nivel de divizare mitotică a celulei, prin inhibarea formării fusului de diviziune. Drept rezultat, anafaza și telofaza sunt distorsionate, iar după metafază în celulă rămâne un număr dublu de cromozomi [121, 235].

În ceea ce privește modalitatea de administrare a colchicinei, pot fi menționate trei nivele generale: 1) semințe uscate, prin introducerea lor în soluție; 2) plantule, prin inocularea soluției în sistemul radicular; 3) plantule, prin inocularea soluției în meristema apicală. Introducerea semințelor în soluție, se consideră cea mai simplă metodă. De obicei, în cazul administrării la nivel de boabe uscate se utilizează soluții în concentrații de 0,01-0,06%. La tratarea semințelor cu colchicină, temperatura prezintă un factor cheie important, care urmează a fi luat în considerație. Esența constă în faptul, că la temperatura de 24-28°C se manifestă cea mai înaltă activitate mitotică. Cu cât este mai intensă divizarea celulelor în timpul acțiunii colchicinei, cu atât mai mare este și probabilitatea dublării setului de cromozomi. Colchicina se administrează la nivel de sistem radicular, în cazul când meristema apicală nu este accesibilă. De menționat, că multe culturi precum porumbul prezintă sensibilitate înaltă la acțiunea alcaloidului. Inocularea acestuia la nivel de meristemă, se efectuează prin diverse procedee, cel mai des - prin injectare, sau prin introducerea sistemului radicular în soluție [20].

Chase (1952) a fost printre primii, care a utilizat colchicina ca agent de dublare a cromozomilor la haploizi utilizând soluția de 0,05%. De asemenea, autorul a presupus că metoda permite obținerea unui număr mare de plante fertile, în acest scop colchicina fiind utilizată și de alți cercetători. Cea mai eficientă metodă de dublare cu colchicină a fost propusă de autorii Б. Юдин, М. Хватов [34]. Administrarea se face prin penetrarea plantulei cu un fir de ață la înălțimea de 1-2 mm de la zona de creștere, capetele acesteia fiind introduse într-un vas cu soluție de colchicină de 0,05% pentru 24 ore. Prin acest procedeu, circa 20% din plantulele tratate au avut sectoare diploide, iar plantule letale nu s-au atestat.

Un factor important în dublarea cromozomilor la haploizi cu colchicină, prezintă concentrația acesteia. S-a constatat, că paralel cu creșterea concentrației se mărește incidența plantulelor moarte. Pentru elaborarea metodelor eficiente de dublare a cromozomilor, este necesară investigarea unui sistem complex de factori – concentrația soluției, temperatura, faza de dezvoltare a plantei, modul de administrare și durata tratamentului și vigoarea plantei [34].

Autorul С. Хохлов и др. (1976), studiind celulele haploide și diploide după tratarea plantulelor cu colchicină la nivel de sistem radicular, a constatat că în primele trei zile de la tratare, frecvența celulelor diploide este de 50% după care începe să diminueze, la ziua 6 numărul acestora constituind doar 8%. Autorul explică fenomenul prin faptul că ciclul mitotic la celulele haploide, comparativ cu cele diploide este mai scurt, din care cauză numărul celulelor acestora se majorează mai repede decât la cele diploide. De asemenea, este necesar de menționat, că numărul de celule este determinat nu doar de metoda de aplicare, dar și de condițiile în care planta este menținută după tratare [24].

Pentru dublarea numărului de cromozomi la haploizi, paralel cu colchicina se utilizează și alte substanțe chimice. Una din acestea este protoxidul de azot – un gaz ce se administrează prin aparate speciale sub presiune înaltă – 2-10 atm, pe o perioadă de la câteva ore la câteva zile. La multe culturi utilizarea protoxidului de azot a favorizat dublarea cromozomilor [144, 151]. Se aplică și unele erbicide ca pronamidele, trifluralinul, cu acțiune asupra diviziunii mitotice [241]. În calitate de agent de dublare, pentru multe specii se utilizează orozalina. Spre exemplu, la *Quercus suber* utilizarea orozalinei în concentrația de 0,01μm timp de 48 ore, favorizează o dublare eficientă a cromozomilor [192]. Recent s-a demonstrat, ca la *Brassica napus* dublarea cromozomilor cu trifluralină asigură un randament de 85,7% plante fertile, cu colchicină – 74,1% și orozalină – 66,5% [152].

Dintre metodele de dublare a cromozomilor la porumb cu utilizarea colchicinei, cel mai frecvent se utilizează două. Prima, elaborată de Э. Забирова и др. (1996) constă în administrarea internă a soluției de colchicină cu seringă la plantule cu 3-4 frunze. Soluția de colchicină de 0,0125% suplimentată cu DMSO (dimetilsulfoxidă) de 0,5% se injectează la 3-5 cm înălțime de la zona de creștere. Autorii menționează, că acest procedeu permite obținerea a 60% de plante cu număr dublat de cromozomi și care au panicul fertil, ceea ce permite autopolenizarea și crearea liniilor DH [15]. Această metodă este eficient utilizată la dublarea cromozomilor la genotipurile de porumb cu conținut majorat de proteină și lizină cu endospermul o_2 (*opaque-2*), în vederea creării unor forme tetraploide și studiului manifestării genei recesive endospermale o_2 în

genomul tetraploid, pentru care sunt caracteristice unele particularități morfologice, fiziologice și biochimice valoroase [5].

A doua metodă propusă de S. Deimling și colab. (1997), constă în creșterea plantulelor, până la etapa când coleoptilul atinge lungimea de 4 cm, după care partea superioară a coleoptilului se înlătură, iar plantula se introduce în soluție de colchicină de 0,06% și DMSO de 0,5% pentru 12 ore. Autorii menționează, că procedeul permite restaurarea fertilității masculine la aproximativ 40% plante tratate. În cazul autopolenizării, 10-20% de plante formează boabe cu embrion normal [91].

De rând cu procedeul chimic, numărul cromozomilor poate pot fi dublat și pe cale genetică [51]. La porumb există doi mutații meiotici care produc gameți diploizi nereduși – *asynaptic 1 (as 1)* [35, 178] și *elongate 1 (el 1)* [199]. Teoretic, utilizarea ambilor mutații pentru dublarea cromozomilor este posibilă, însă în practică la moment a fost utilizată doar mutația *elongate 1*.

Rezultate notabile în vederea creării liniilor DH au fost obținute prin utilizarea tehnicilor *in vitro* din haploizii obținuți prin androgeneză. Autorii Antoine-Michard și Beckert (1997) au raportat despre obținerea haploizilor cu număr de cromozomi dublați spontan, cu frecvență de până la 40% în cultura de stamine [40].

De obicei, un anumit procent de embrioni nu sunt pretabili pentru trecerea la un alt nivel de ploidie și rămân haploizi. Rata acestora variază mult în funcție de cultură, genotip și condiții. Spre exemplu, frecvența dublării spontane a cromozomilor la porumb variază de la 0 la 21,4% [43] și de la 10 la 49% la *B. napus* [125]. Ca excepție, servește dublarea spontană la unele genotipuri elită de orz – 87% [128]. Acest fenomen permite excluderea etapei de dublare a numărului de cromozomi și obținerea directă a liniilor DH. Totuși, mecanismul prin care la embrioni, calus sau microspori garnitura de cromozomi se dublează spontan nu este încă suficient elucidat.

Cultura de antere, embrioni, microspori *in vitro* a devenit metodă sigură de obținere a plantelor haploide, iar factorii ce induc dublarea artificială a cromozomilor sunt incorporați direct în cultură [237]. Conform datelor din literatură, dublarea spontană a cromozomilor *in vitro* are loc prin trei mecanisme generale alternative, cu ciclul celular normal: endoreduplicarea (duplicarea ADN-ului fără mitoză), fuziunea nucleară și endomitoza (mitoză fără formarea fusului de diviziune și degradarea anvelopei nucleare). Endoreduplicarea este un mecanism comun de majorare a setului de cromozomi pe parcursul ciclului celular normal. Se presupune că la plantele cu flori, dublarea spontană are loc în circa 90% cazuri. Totuși, a fost depistat și un al

patrunea mecanism, declanșat de unii factori ce induc dublarea cromozomilor – folosirea colchicinei la restabilirea fertilității prin tehnicile *in vitro*, mecanism numit mitoză-c [139].

S-a stabilit, că concentrația colchicinei și perioada administrării acesteia prezintă factori importanți la dublarea cromozomilor în androgeneză [61]. Prin aprecierea frecvenței dublării și anomaliilor embrionare s-a constatat, că tratamentele pe perioade scurte sunt mai eficiente, decât cele îndelungate [79, 253, 254]. Genotipul, de asemenea prezintă un factor decisiv al eficienței acțiunii colchicinei [43].

Colchicina, la dublarea cromozomilor *in vitro* poate fi administrată la diferite faze de dezvoltare: 1) plantă integră, sau anumite părți deja regenerate, 2) embrion, derivat din microspori, 3) în timpul inducerii androgenezei. Cea mai simplă și acceptabilă cale de administrare a colchicinei este la nivel de plantule deja regenerate. Acestea pot fi introduse complet în soluții de colchicină pe diferită perioadă de timp. Totuși, eficacitatea acestui procedeu este diminuată întrucât un număr mare de plantule pier sau dezvoltă anomalii. Ca alternativă, colchicina se mai administrează în organe sau țesuturi specializate – rădăcini, muguri auxiliari, sau meristemă apicală la plantele deja regenerate. Se consideră, că un efect poate fi mai dirijat atunci când colchicina este dizolvată în apă cu lanolină, DMSO, sau cu o altă o substanță, capabilă de transport și păstrare în locul respectiv pentru o anumită perioadă. Cu toate acestea, procedeele date încă nu sunt pe deplin acreditate. Autorii, fără careva rezultate definitive au încercat să dubleze numărul de cromozomi la plantele de pepene galben, folosind colchicina dizolvată în lanolină. Ca rezultat, s-a depistat apariția diploizilor, mixoploizilor și doar a câțiva haploizi de la una și aceeași cultură [166].

Colchicina, de asemenea poate fi administrată pentru dezvoltarea embrionilor androgeni [192] sau calusurilor [196], deși un dezavantaj serios al acestor procedee constă în diminuarea capacității de supraviețuire. Mai eficientă se consideră aplicarea directă a colchicinei la fazele inițiale de dezvoltare a embrionilor haploizi. În plus, administrarea la etape mai timpurii este mult mai economicoasă, iar numărul plantelor cu diverse tipuri de deformare este mai mic [192]. La porumb [210] și grâu [42], utilizarea directă a colchicinei la cultura de antere a permis sporirea randamentului de obținere a embrionilor din calus cu capacitate de regenerare și dezvoltare a plantelor dublu haploide.

Totuși, în virtutea unor dezavantaje obținerea haploizilor și dublu haploizilor în cultura de antere este foarte puțin utilizată de specialiștii în biotehnologie și ameliorare. Multe dintre genotipuri se dezvoltă slab în condiții *in vitro*, sau chiar deloc. De asemenea, liniile obținute în cultura de antere demonstrează instabilitate, cu toate că conform unor relatări, aceste DH linii au

un nivel înalt de homozigoție [179, 180, 190]. Plus la aceasta, metodele de dublare a cromozomilor *in vitro* sunt costisitoare și laborioase.

1.6.2. Utilizarea plantelor haploide în ameliorare

Actualmente, pentru producerea hibridilor de porumb sunt utilizate diverse scheme prin intermediul liniilor dublu haploide [107, 111, 170, 219, 229].

Printre primele linii homozigote obținute prin tehnologia haploidiei se menționează *B. napus* L. [230] și *Hordeum vulgare* L. [127]. Despre cultura de grâu se cunoaște că unele soiuri create prin haploidie au devenit predominante în unele regiuni ale lumii [135].

O absență importantă a haploizilor din registrul de specii de plante superioare sunt cele lemnoase [38]. Conform unor opinii, aplicarea tehnologiei haploidiei, ar constitui un avantaj suplimentar pentru biotehnologiile ce vizează ameliorarea acestora [187].

La cultura de porumb, tehnologia liniilor DH permite obținerea liniilor pure timp de două generații. Comparativ cu metodele tradiționale procesul se micșorează de 2-3 ori. În prima generație se obțin haploizi din materialul inițial, a doua generație prevede dublarea genomului haploid (Figura 1.4).

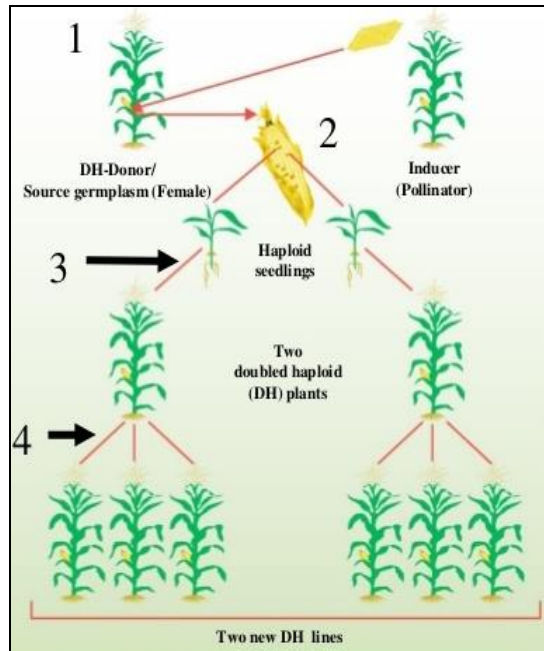


Fig. 1.4. Schema de obținere a liniilor homozigote de porumb prin tehnologia dublării numărului de cromozomi la plantele haploide (1 - germoplasma donor; 2 - inducator; 3 - plante haploide; 4 - plante dublu haploide) [169].

Tehnologia haploidiei s-a dovedit a fi unanim acreditată la obținerea liniilor pure și îmbunătățirea speciilor cu caractere agronomice valoroase, fiind implicate în diverse programe de ameliorare și producere. Această tehnologie a marcat avantajul economic al producerii liniilor homozigote și hibrizilor la diferite culturi, realizată prin intermediul plantelor DH [135, 242, 246].

Faptul că homozigoția este asigurată într-o singură generație, oferă producătorilor posibilitatea de a renunța la numeroasele cicluri de autopolenizări, care deseori nu asigură o homozigoție absolută a locilor. Din atare motiv, utilizarea tehnologiei haploidiei permite producătorilor de a reduce timpul și cheltuielile la producerea liniilor pure la diverse culturi. Actualmente, liniile DH se utilizează în ameliorarea a peste 200 specii. De asemenea, din peste 300 derivați DH în lume s-au creat 12 specii noi [104, 105].

Homozigoția liniilor DH se stabilește la nivel genetic aplicând tehnici bazate pe cercetarea izoenzimelor [56, 117, 164, 228, 231], cât și a markerilor ADN [49, 62, 92, 97, 239].

Informațiile privind aplicarea liniilor DH în ameliorare, până la Chase care a început să utilizeze haploizii materni la obținerea liniilor pure de elită pentru crearea hibrizilor comerciali de porumb în cadrul firmei americane De Kab Agricultural Association Inc, erau restrânse [70, 71, 72]. Se consideră, că Chase a obținut primul hibrid prin haploidie – De KAbb 640, creat în baza a 4 linii, din care 3 au fost de origine haploidă. Timp de mai mulți ani, hibridul era unul din cei mai utilizați în industria porumbului în SUA, de altfel, fiind răspândit și pe piața comercială din Europa: sudul Franței, nordul Italiei, bazinul Dunării și alte regiuni [105]. Autorului Chase i se datorează și multe realizări de pionerat la producerea porumbului prin haploidie: 1) autopolenizarea primilor haploizi, 2) producerea industrială a liniilor DH [75].

Plantele haploide oferă un spectru larg de utilizare în ameliorarea porumbului în gospodăriile de fermieri din regiunea Krasnodar (Federația Rusă) [14, 15, 16, 30, 31, 33]. Cele mai bune linii au servit ca părinți la crearea hibrizilor. Testarea hibrizilor obținuți prin haploidie a demonstrat, că capacitatea combinativă a liniilor DH nu cedează liniilor create pe cale tradițională. De exemplu, linia DH Kp716 a servit ca linie parentală pentru 4 hibrizi incluși în registrul de stat și utilizați în producerea porumbului în Caucazul de Nord și regiunile inferioare ale râului Volga [30].

Ca rezultat al cercetărilor autorilor chinezi Ku et al. (1978); Miao et al. (1981), cultura de antere a fost prima biotehnologie de producere a liniilor DH de origine androgenă la porumb. Cel mai mare efort la utilizarea acestei tehnici a fost depus la îmbunătățirea capacității genotipurilor

de a se dezvolta *in vitro*. Printre genotipurile care posedă capacitate înaltă de dezvoltare *in vitro* se remarcă cele de tip exotic, din China [43, 44, 45].

Cercetarea polenului cu capacitate de inducere a haploizilor androgeni a demonstrat caracterul genetic al acestuia [180]. *In vitro*, capacitatea androgenă poate fi transmisă de la genotipurile exotice la liniile elită cu caractere agronomice valoroase [43]. Aceasta este posibil de realizat prin intermediul liniilor DH obținute din sursele exotice. Cercetări în direcția dată s-au realizat la Institutul Martonvasar din Ungaria, în scopul ameliorării tehnologiei culturii *in vitro* și eficienței utilizării plantelor DH de origine androgenă. Barnabas și colab. (2005) au demonstrat posibilitatea transmiterii caracterului de regenerare în condiții *in vitro* de la liniile DH de origine exotică la cele cu productivitate înaltă. În cercetare au fost incluse linii elită, mai întâi încrucișate cu plantele DH din sursele exotice, apoi supuse tehnicii *in vitro*. Rezultatele obținute au demonstrat că 0,5-18% din materialul ce s-a dezvoltat normal din cultura de stamine, a fost fertil și a putut fi autopolenizat [46].

Unele date relatează despre utilizarea în producere a genotipurilor de origine androgenă din soiul *Braebun* de măr. Totuși, rezultatele au fost modeste, deoarece formele androgene au demonstrat viabilitate redusă și sterilitate severă [238]. Se cunosc date despre obținerea primelor plante de cafea de origine androgenă [158].

Odată cu descoperirea fenomenului de haploidie, a început schimbul de opinii cu privire la aplicarea acestuia în lucrările de ameliorare – implicarea haploizilor în selecția recurentă. Unii cercetători au pus în evidență perspectivele teoretice ale acestor investigații, precum și posibilitatea sporirii eficacității selecției recurente, prin utilizarea în calitate de material inițial a plantelor dublu haploide [28, 65, 103, 206, 208].

Autorul A. Gallais (1988) a demonstrat, că strategia optimă de obținere a liniilor homozigote este efectuarea concomitentă a ameliorării populației inițiale și obținerea acestora în calitate de produs accesoriu al selecției recurente. În lucrările ulterioare, la compararea diferitelor scheme de selecție recurentă cu folosirea liniilor DH s-a stabilit că cea mai bună metodă este *o plantă – un descendent dublu haploid*. De la o plantă din populație se obține o singură linie DH, ulterior se selectează liniile cele mai bune, care se încrucișează pentru crearea populației pentru următorul ciclu de selecție [107].

B. Forougi-Wehr și G.Wenzel (1990) au elaborat câteva scheme de selecție recurentă la orz cu selectarea genotipurilor valoroase dublu haploide. Prima schemă a fost destinată pentru transmiterea caracterului de rezistență la virusul mozaicului galben *Ba YM* de la o linie de orz de toamnă. Modelul presupune încrucișarea reciprocă a două linii de orz, obținerea haploizilor din

hibridul F_1 , dublarea numărului de cromozomi și selectarea dublu haploizilor conform caracterului selectat. Autorii consideră, că strategia propusă poate fi eficientă nu numai pentru transmiterea unui caracter monogenic, dar și a caracterelor moștenite cantitativ, la selectarea plantelor dublu haploide acordându-se atenție deosebită caracterelor complexe, inclusiv productivității. Următoarea schemă propusă de aceiași autori – *selecția recurentă cu alternarea etapelor haploide* – a fost elaborată pentru transmiterea caracterelor monogenice, sau a celor moștenite cantitativ de genotipurile neînrudite. Aceasta presupune încrucișarea a două linii parentale și obținerea haploizilor din hibridul F_1 . În scopul vizat, în condiții de seră sau câmp se selectează plante dublu haploide, cu cea mai bună manifestare a caracterului cercetat, după care se încrucișează cu părintele recurent. De regulă, după a 3-a retroîncrucișare (*backcross*), liniile obținute sunt multiplicare și testate în vederea utilizării în ameliorarea tradițională. Selecția recurentă, cu alternarea etapelor haploide a fost aplicată cu succes de cercetători la orz, pentru transmiterea rezistenței la bolile foliare, virusul *Ba YMV* și mărirea masei a 1000 boabe [103].

Selectarea la nivel haploid s-a dovedit a fi eficientă și pentru transmiterea caracterului cercetat de la o sursă exotică la soiurile de orz de toamnă. În calitate de material inițial au servit soiul *Igri* cu productivitate înaltă, dar sensibil la virusul *Ba YMV* și linia japoneză de orz de primăvară cu gena *ym1* – rezistentă la *Ba YMV*, cu productivitate diminuată, predispusă la căderea tulpinilor și sensibilă la ciuperca *Rhynchosporium secalis*. S-a constatat, că selectarea genotipurilor prețioase la nivel haploid este mai eficientă, decât selectarea în populațiile segregante F_2 , F_3 ș.a. [93]

Autorii S. Chalyk, V. Rotarenco (1999) au propus utilizarea plantelor haploide în schemele de selecție recurentă la porumb. Fiecare ciclu de selecție conține două etape: prima etapă – obținerea haploizilor din populația sintetică, a doua etapă – creșterea haploizilor, polenizarea acestora cu polen de la diploizii din aceeași populație și selectarea în baza dimensiunilor știuletelui haploizilor. Până în a. 1999 au fost testate două cicluri de selecție recurentă haploidă, în rezultatul căreia au fost îmbunătățite două populații sintetice SP și SA. Determinarea eficacității schemei de selecție recurentă haploidă a demonstrat că aceasta este de 3 ori mai avantajoasă pentru îmbunătățirea productivității populațiilor sintetice, decât schemele obișnuite de selecție recurentă cu selectarea genotipurilor valoroase la nivel diploid. Întrucât organismele haploide posedă o singură alelă în fiecare locus, sunt posibile doar interacțiunile genelor nealele. Asemenea genotipuri sunt deosebit de valoroase, în cercetarea epistaziilor și efectelor aditive implicate în formarea caracterelor cantitative [28, 206, 208].

În general, tehnologia haploidei pentru cultura de porumb avansează cu fiecare an, haploizii fiind utilizați cu succes, atât în cercetare, cât și producere.

1.7. Concluzii la capitolul 1

1. În prezent printre noile metode de ameliorare a porumbului un loc important ocupă tehnologia liniilor dublu haploide. În comparație cu metoda tradițională ce necesită 6-8 generații de autopolenizări recurente, tehnologia DH permite obținerea liniilor homozigote în două generații: prima generație revelează obținerea plantelor haploide; generația a doua – dublarea cromozomilor cu diferiți inhibitori mitotici. Sub acțiunea acestora, în timpul diviziei mitotice fusul de diviziune sau nu se formează, sau are loc clivarea lui timpurie, din care motiv cromozomii nu migrează spre poli și în celulă se păstrează setul dublu de cromozomi.

2. Haploizii reprezintă plante sau embrioni cu garnitura redusă de cromozomi (n), comparativ cu forma inițială ($2n$). Conform paternului de moștenire, haploizii se clasifică în: haploizi materni (matroclini), paterni (androclini) și androgeni. Plantele haploide posedă talie mică, demonstrează viabilitate redusă în condiții ambientale nefavorabile comparativ cu plantele donatoare și sunt sterili din cauza distorsionării meiozei și/sau nedevelopării gameților. Haploizii pot apărea și spontan dar cu frecvență foarte redusă, motiv pentru care au fost elaborate metode de inducere artificială a haploidiei.

3. Inductorii reprezintă genotipuri cu capacitate specifică de inițiere a dezvoltării boabelor cu embrion haploid în rezultatul încrucișării cu plantă diploidă (normală). Pentru diferențierea boabelor, sau plantulelor haploide rezultate prin inducerea haploidiei de cele dezvoltate prin fertilizare obișnuită, în inductori au fost integrate gene dominante ce controlează sinteza antocianului în țesuturi din embrion și endosperm, în plantă întregră la diferite faze de dezvoltare.

4. Ca rezultat al distorsionării fecundării obișnuite și nedevelopării gameților, majoritatea plantelor haploide sunt sterile, din care motiv dublarea cromozomilor este necesară pentru autopolenizare și menținerea genotipului. Cel mai utilizat agent de dublare este colchicina – alcaloid ce acționează ca inhibitor mitotic care în timpul diviziei celulare inhibă formarea fusului de diviziune, astfel în celulă numărul de cromozomi dublându-se. Pe lângă colchicină, la dublarea cromozomilor se utilizează și alți agenți cu acțiune antimitotică. Cu toate acestea, metodele utilizate demonstrează eficacitate minoră, afectează puternic viabilitatea plantei, doar un mic număr de plante redevenind fertilitate. În plus, plantele dublu haploide de obicei produc

cantități insuficiente de polen pentru autopolenizare, din care cauză pe știulete se formează puține boabe.

5. Oportunitatea obținerii dirijate a unui procent înalt de haploizi, comparativ cu apariția spontană a acestora, a favorizat concentrarea cercetărilor asupra creării inductorilor haploizi, cu potențial haploid înalt și sistem de gene marker eficient la evidențierea haploizilor. Totuși în lucrările practice cu inductorii, deseori se constată, că crearea *de novo* a acestora și ameliorarea caracterelor definitorii necesită noi cunoștințe pentru obținerea liniilor performante. Metodele de dublare a cromozomilor, de asemenea presupune o cercetare minuțioasă a factorilor ce induc dublarea setului haploid și restabilirea fertilității masculine.

Analiza unui număr amplu de surse bibliografice a permis elaborarea **scopului** cercetărilor la tema propusă: eficientizarea tehnologiei de creare a liniilor homozigote prin explorarea fenomenului de inducere a haploizilor materni la porumb (*Zea mays* L.).

Pentru realizarea scopului propus a fost necesară trasarea următoarelor **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.

Problema științifică propusă spre soluționare 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 contribuie* la majorarea randamentului de obținere a genotipurilor haploide și reducerea termenului de obținere a liniilor homozigote.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

Investigațiile efectuate în scopul creării noilor linii cu capacitate de inducere a haploizilor materni la porumb au fost realizate pe parcursul anilor 2008-2014 pe câmpurile experimentale ale Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM.

2.1. Material de studiu și condiții de cultivare

În calitate de material inițial de cercetare au servit populațiile hibride create prin combinarea a trei linii inductoare de haploizi la porumb – Stock 6, ZMS și MHI.

❖ Stock 6 [85] – linia are un potențial de inducere a haploizilor de 2-3%. Sistemul marker este format din genele *BI*, *PII* și *RI-nj*, care permite evidențierea haploizilor la diferite faze de dezvoltare. Plantele inductorilor ating înălțimea de până la 150 cm (Figura 2.1).



Fig. 2.1. Linia Stock 6.

În procesul creării noilor inductori, Stock 6 a prezentat o sursă de gene marker – *BI* și *PII*. *BI* este o alelă a locusului *bl*, localizată în cromozomul 2 (Figura 2.2), iar *PII* este o alelă a locusului *pII* localizată în cromozomul 6 (Figura 2.3).



Fig. 2.2. Localizarea genelor *B1* și *P1* la nivel de cromozom [256, 257].

Markerii *B1* și *P1* fac parte din grupa genelor ce controlează sinteza pigmentului antocianic în țesuturile plantei și determină colorația purpurie la etapa de plante mature în zonele expuse luminii solare (Figura 2.3).

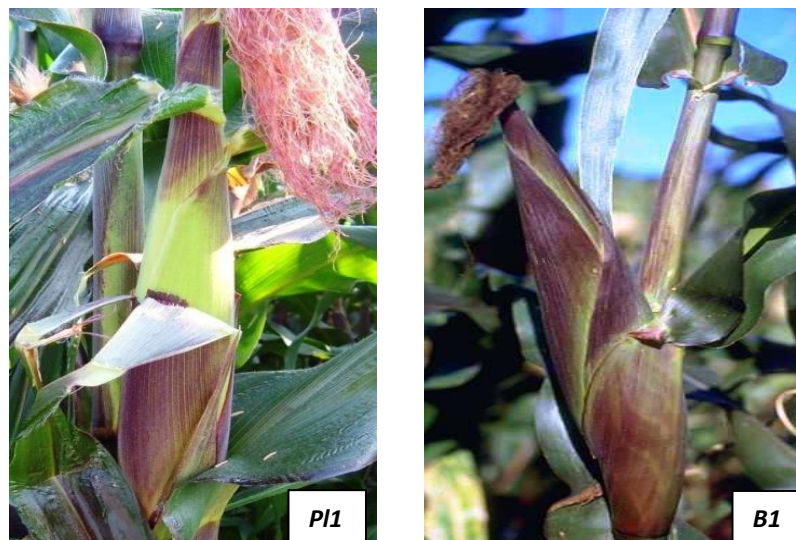


Fig. 2.3. Expresia fenotipică a genelor *P1* și *B1* la faza de plante mature.

Asocierea genelor *B1* și *P1* într-un singur genotip determină sinteza activă a pigmentului antocianic, și ca rezultat planta la etapa de maturație capătă colorație violetă (Figura 2.4 A). Pigmentația poate fi accentuată, independent de prezența sau lipsa luminii solare. Pentru aceasta, este necesară prezența genelor menționate în stare dominantă, culoarea intensă fiind asigurată de *B1*, iar independența de lumină – de *P1*. Prezența genelor *B1*, *P1* în același genotip determină, de asemenea, pigmentarea violetă la nivel de sistem radicular la plantule de 3-4 zile (Figura 2.4 B).

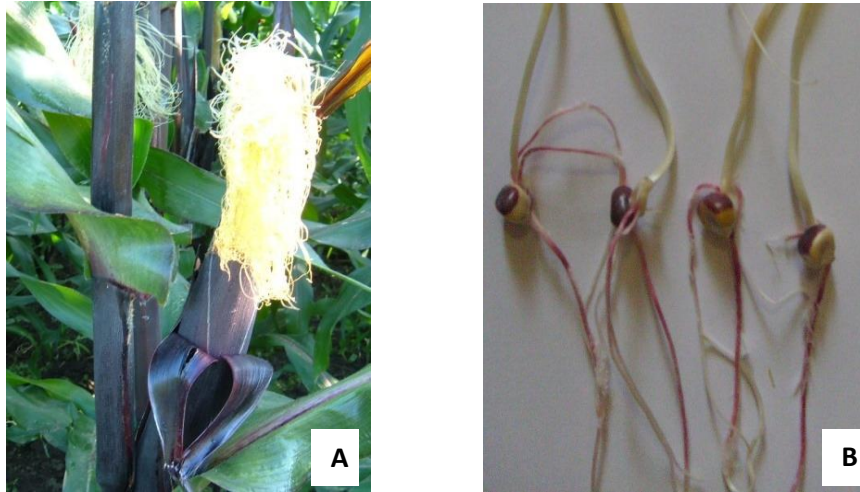


Fig. 2.4. Manifestarea fenotipică a genelor *B1* și *P11* la faza de plante mature (A) și plantule de 3-4 zile (B).

❖ MHI (*Moldavian Haploid Inducer*) [63] – induce haploizi cu frecvență de 6-8%. Conține genele marker *A1*, *P11*, *C1*, *R1-nj* care fac posibilă identificarea haploizilor la diferite faze de dezvoltare. Plantele ating înălțimea de 160-180 cm (Figura 2.5). În cercetările noastre MHI a prezentat interes pentru capacitatea înaltă de inducere a haploizilor și caracterele cantitative bine ameliorate.



Fig. 2.5. Linia MHI (*Moldavian Haploid Inducer*).

❖ ZMS (*Zarodișevii Marker Saratov*) [32] – induce haploizi cu frecvență de 1-4%. Sistemul marker este format din genele *A1*, *C1* și *RI-nj* ce permit identificarea haploizilor în baza colorației boabelor uscate. Plantele ating înălțimea de până la 130 cm (Figura 2.6).



Fig. 2.6. Linia ZMS.

Linia ZMS a servit ca sursă de gene marker ale embrionului. Din acest grup face parte gena *RI-nj*, alelă a locusului *r1*, localizată în cromozomul 10 (Figura 2.7), ceea ce determină sinteza antocianului în stratul aleuronic al endospermului și în embrion la faza de boabe uscate (Figura 2.8).

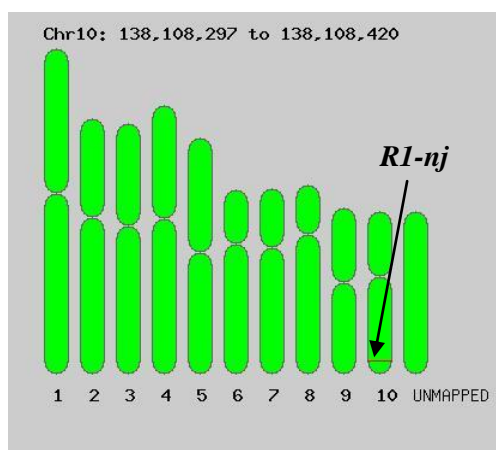


Fig. 2.7. Localizarea genei *RI-nj* la nivel de cromozom [258].

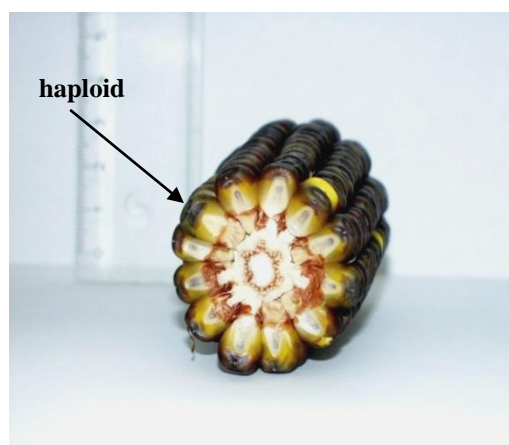


Fig. 2.8. Manifestarea fenotipică a genei *RI-nj* la faza de boabe uscate.

În fiecare sezon materialul a fost semănat când temperatura solului timp de trei zile consecutiv a constituit 8-9°C. Inductorii și donorii au fost semănați manual pe parcele separate.

Pentru a optimiza perioada de polenizare, atât inductorii, cât și donorii au fost semănați în diferite termene, adâncimea fiind de 5-7 cm. La distanța între rânduri și plante de 70 cm, densitatea plantelor și semințelor a constituit 4 plante per m². La faza de plantule de 3-4 frunze s-a efectuat răritul, lăsându-se câte două plante în cuib. Combaterea buruienilor pe terenul experimental s-a efectuat pe cale mecanică (manuală).

2.2. Aprecierea capacității de inducere a haploizilor

Pentru crearea materialului de cercetare, între inductorii inițiali timp de două sezoane de vegetație 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). Pentru aprecierea capacității de inducere a haploizilor, inductorii de diferite generații au fost implicați în încrucișări cu donori – plante maternelle (genotipuri din care s-au obținut haploizii). Pentru inductorii F₃ și F₄, rata de inducere a haploizilor s-a determinat separat la fiecare plantă inductor cu caractere valoroase. Astfel, s-au realizat încrucișări la nivel de *plantă donator x plantă inductor*. Capacitatea de inducere a inductorilor F₅ și F₆ s-a determinat 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 donator x familie inductor*, adică pentru polenizare s-a utilizat polenul colectat de la întreaga familie.

În scopul vizat, în calitate de donori s-au utilizat populațiile sintetice SPC₄, SAC₃, SPC₄ x SAC₃ și diferiți hibrizi. Populația sintetică SPC₄ a fost creată prin încrucișarea a patru linii MK01y, B346C, ms1334, Co125 cu soiului *Englezesc timpuriu*, după următoarea schemă: [(P346C x Englezesc timpuriu) x (ms1334 x MK01y)] x (Co125 x MK01y), iar populația sintetică SAC₃ – a liniilor N384M, P092, rf7 cu MK159, conform schemei: (N384M x P092) x [(P092 x (Rf7 x MK159))].

Pentru aprecierea capacității de inducere a haploizilor de către inductori, în fiecare descendență s-au utilizat următorii donori:

- F₃ – populația SPC₄,
- F₄ – populația SPC₄ x SAC₃,
- F₅ – populațiile SPC₄ x SAC₃, SAC₃ și hibridul MK109×Ky123,
- F₆ – populația SPC₄ x SAC₃ și hibridul Debiut.
- Liniile LHI – diferiți hibridi oferiți de Institutul de Fitotehnie „Porumbeni”.

Frecvența haploizilor s-a determinat la faza de boabe uscate în baza expresiei genei marker *RI-nj* (Figura 2.9).

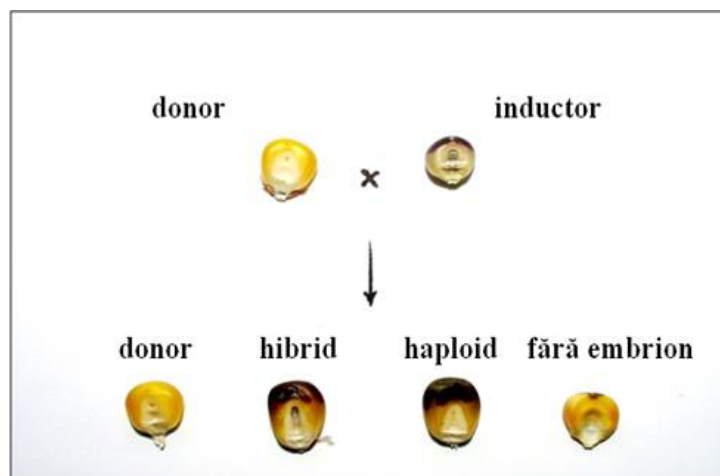


Fig. 2.9. Diferența între haploizi și alte tipuri de boabe conform colorației manifestate de gena *RI-nj*.

S-a determinat înălțimea plantei (cm) și lungimea paniculului (cm) la inductorii F₅ și F₆, la inductorii F₆, fiind stabilite suplimentar și perioada de polenizare (zile), cantitatea de polen (g) produsă de plantă per zi. Polenul s-a cântărit la cântarul electronic cu precizia de 0,001 g. Materialul vizualizat a fost fotografiat cu aparatul digital (Canon Power Shot A1100).

2.3. Analiza fenologică a expresiei genelor *BI*, *PII* și *RI-nj* la descendenții segreganți

O atenție deosebită s-a acordat analizei fenologice a expresiei genelor *BI* și *PII* la faza de plante mature la descendenții segreganți F₃-F₆. De altfel, selectarea plantelor cu cea mai intensă colorație a constituit unul din principalele criterii de selecție (Figura 2.10).



Fig. 2.10. Plante cu diferit grad de pigmentație antocianică, determinată de genele *Bl* și *Pl*.

În descendența F_6 s-a analizat expresia genelor *Bl* și *Pl* la plantule de 3-4 zile, obținute ca rezultat al încrucișării inductorilor cu diferiți donori. Boabele 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 au sistem radicular necolorat (Figura 2.11).



Fig. 2.11. Diferența între haploizi (n) și diploizi ($2n$) conform expresiei *Bl* și *Pl*.

Pentru determinarea gradului de intensitate a pigmentării antocianice a embrionului și endospermului controlată de gena marker *R1-nj* s-a utilizat scara de 5 trepte:

0 – lipsa pigmentației; 1 – pigmentare foarte slabă; 2 – pigmentare slabă; 3 – pigmentare medie; 4 – pigmentare puternică.

2.4. Procedee de dublare a numărului cromozomilor cu colchicină la plantele haploide

În calitate de material de cercetare s-au utilizat plantule haploide n (MK109), n (Rf7×Ky123) obținute ca rezultat al încrucișării donatorilor MK109 și Rf7×Ky123 cu liniile inductoare de haploizi. Haploizii au fost crescuți până la faza de 3-4 frunze, fiecare genotip fiind însămânțat pe parcelă separată în cinci rânduri, a câte 3 m lungime, cu distanță de 35 cm între rânduri și 20 cm – între plante. Ca factor de dublare a numărului de cromozomi la genotipurile haploide a servit alcaloidul colchicina. 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.

Procedee de dublare a cromozomilor la haploizi în condiții de câmp

Procedeeul „găurire” – prevede penetrarea plantulei cu un fir de ață la nivelul zonei de creștere, după care va fi înfășurată ulterior cu ață tehnică îmbibată în soluție de colchicină, și învelită cu bandă adezivă pentru a nu permite evaporarea soluției pentru anumită perioadă de timp (Figura 2.12).

Procedeeul „tivitură” – constă în tivirea zonei de creștere, capetele aței cu lungimea de 4-5 cm fiind introduse în eprubetă cu soluție de colchicină (Figura 2.13).



Fig. 2.12. Procedeeul „găurire”.



Fig. 2.13. Procedeeul „tivitură”.

Procedeuul „absorbție” este asemănător primului procedeu, iar diferența constă în lipsa găuririi zonei de creștere a plantulei.

Procedee de dublare a cromozomilor la haploizi în condiții de laborator

Metoda propusă de Deimling [91] în cercetarea dată a servit ca martor (Figura 2.14). Este una din cele mai utilizate metode de dublare a numărului de cromozomi la haploizi. Constă în germinarea boabelor până la faza, când coleoptilul va avea în medie 4 cm (1), se înlătură partea superioară (2), plantulele sunt introduse în soluție de colchicină de 0,06% + DMSO de 0,5% pentru 12 ore, după care sunt transferate și plantate în câmp (3).

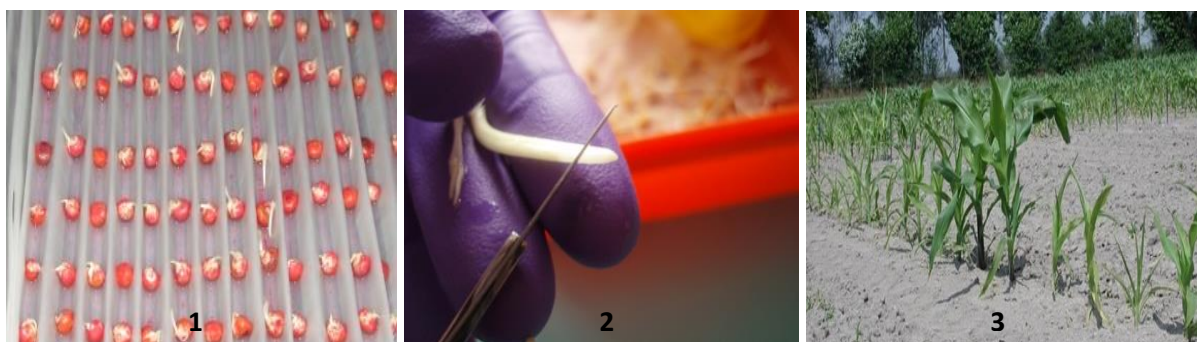


Fig. 2.14. Etapele dublării cromozomilor la plantulelor haploide, conform metodei propuse de Deimling.

S-au efectuat observații fenologice în ce privește dezvoltarea plantelor după administrarea cu colchicină până la faza de maturitate deplină. Eficacitatea metodelor de dublare a cromozomilor s-a determinat în baza numărului de plante cu paniculi fertili care după autopolenizare formează boabe.

Testarea noilor linii inductoare de haploidie LHI 2, LHI 3 și LHI 7, create s-a efectuat pe fondalul diferitelor genotipuri de porumb ce reprezintă covarietățile *Zea mays dentata* și *Z. mays indurata*, oferite cu amabilitate de Institutul de Fitotehnie “Porumbeni”, dar și în cadrul IGFPP al AȘM.

2.5. Analiza statistică a datelor obținute

Metodele biometrice utilizate în genetică și ameliorare, sunt orientate de cele mai multe ori spre optimizarea (sporirea eficienței și fezabilității, accelerarea și diminuarea cheltuielilor) procesului de creare a soiurilor de culturi agricole și alegerea condițiilor optime de cultivare a plantelor. Aceste deziderate pot fi realizate prin construirea modelelor matematice ale

variabilității caracterelor agronomic valoroase pentru plantele particulare, grupuri de plante, populații, dar și agrofitecenoze. Ca bază a oricărei metode genetico-biometrice 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 [57, 182].

Datele obținute au fost prelucrate statistic în baza analizelor varianței (\bar{x} – media aritmetică; m_x – eroarea mediei; S_{mx} , – eroarea totală (%), σ – deviația standard; V – coeficientul de variație, %). S-au efectuat, de asemenea, analiza bifactorială a varianței, analize clusteriene, analiza corelațională (gradul și orientarea dependenței între factori) și regresională (ecuația matematică a dependenței). Autenticitatea deosebirilor s-a stabilit în baza testului t , la nivelul de probabilitate $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ în pachetul de soft STATISTICA 7.

În scopul elucidării particularităților de repartiție a plantelor în clase fenotipice au fost utilizate *histogramele* - o modalitate de prezentare a datelor statistice în formă de diagramă formată din coloane. Ele reflectă distribuția valorilor particulare, din care motiv se și mai numesc *frecvență de distribuție*. Înălțimea coloanei indică frecvența valorilor în diapazonul cercetat, iar numărul coloanelor – numărul claselor. Un avantaj incontestabil al histogramei constă în faptul că acestea permit de a stabili ușor tendința de schimbare a parametrului cercetat, centrul, diapazonul/variabilitatea și forma de distribuție a valorilor [37].

Analiza factorială a varianței face posibilă stabilirea contribuției diferitelor surse ale variației (genotip, mediu, interacțiunea acestora, ș.a.) în formarea fenotipului caracterului. Cunoașterea acestei contribuții oferă oportunități înalte pentru elaborarea strategiilor de selecție a plantelor [60].

Analizele clusteriene – proceduri statistice polidimensionale care repartizează obiectele/ genotipurile în grupuri/clustere similare. S-au efectuat prin construirea dendrogramelor de distribuție – metodă ierarhică și prin analiza *k-mediilor* – metodă centroidă, frecvent aplicate în cercetările biologice [18, 200, 248].

Frecvența haploizilor (%) s-a calculat conform formulei: $[\text{num.boabelor haploide} / \text{num.total boabe}] \times 100\%$.

2.6. Concluzii la capitolul 2

În legătură cu *scopul* și *obiectivele* propuse, a fost elaborat cadrul conceptual metodic de investigații în vederea:

- 1) implicării materialului inițial cu oportunități înalte de obținere a noilor linii inductoare de haploidie la porumb, cu randament mai avansat decât la liniile cunoscute;
- 2) asocierii reușite într-un singur genotip a genelor marker ce controlează sinteza antocianului la diferite etape de dezvoltare a plantelor și stabilirea particularităților de expresie a acestora;
- 3) elaborării schemei de încrucișări pentru obținerea combinațiilor hibride cu anumit raport de germplasmă *maternă* : *paternă*;
- 4) testării noilor linii create – LHI 2, LHI 3, LHI 7 cu privire la capacitatea de inducere a haploizilor pe fundalul diferiților genotipuri-donori;
- 5) optimizării procedurii de dublare a numărului de cromozomi la plantele haploide prin utilizarea inhibitorului mitotic *colchicina* și obținerii liniilor dublu haploide /homozigote;
- 6) aplicării analizelor statistice moderne pentru testarea veridicității datelor obținute.

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

În practica cercetărilor moderne de genetică și ameliorare sunt utilizate generațiile de plante haploide, deoarece asigură reducerea semnificativă a perioadei de obținere a noilor genotipuri, iar originea dublu haploidă a liniilor create corespunde întru totul criteriilor de diversitate, uniformitate și stabilitate genetică [69].

În ultimele decenii, la producerea porumbului intens se utilizează plantele dublu haploide (DH). Aceasta a devenit posibil datorită progresului avansat al tehnologiei de inducere *in vivo* a haploidiei. Producerea liniilor DH din germoplasma heterogenă (donor) reprezintă un proces ce durează două generații. În prima generație, haploizii sunt obținuți din plantele diploide, ca rezultat perechea de cromozomi este redusă la un singur cromozom. Astfel, dintr-un nucleu haploid prin diviziuni repetate se vor forma plante haploide. În generația a 2-a, prin intermediul inhibitorilor mitotici (colchicina) setul haploid este dublat, iar cromozomul din perechea înjumătățită capătă o copie identică. Planta rezultată – dublu haploidă este homozigotă la nivel de 100%. Astfel, liniile DH complet homozigote sunt produse în două sezoane, spre deosebire de cele obținute prin metode tradiționale – prin autopolenizări repetate timp de 6-8 ani (Figura 3.1).

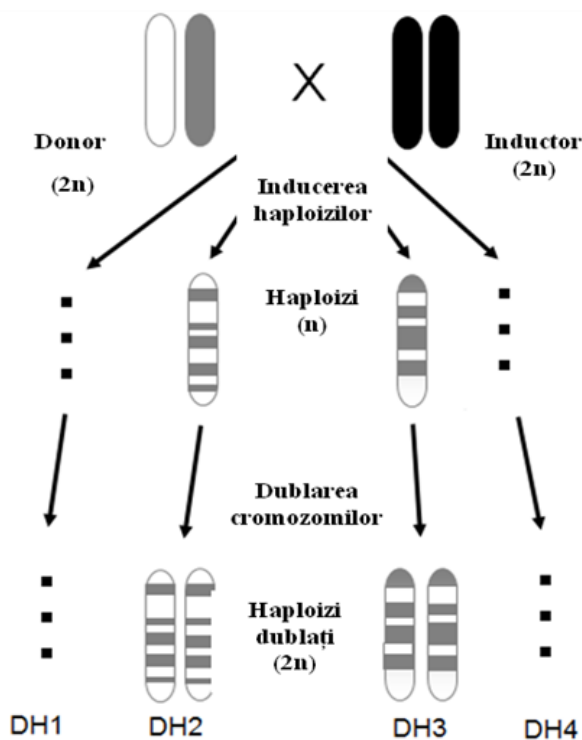


Fig. 3.1. Strategia de obținere a liniilor dublu haploide de plante în baza genomului matern.

3.1. Tehnologia de creare a liniilor inductoare de haploizi materni

Obținerea haploizilor materni a devenit posibilă datorită creării liniilor speciale cu capacitate genetică de a induce din plante diploide boabe cu embrion haploid. Pentru identificarea haploizilor, inductorii conțin anumite gene marker dominante, responsabile de sinteza antocianului în diferite țesuturi ale plantei. Manifestarea fenotipică a markerilor permite evidențierea haploizilor la diferite faze de dezvoltare în descendența F_1 , ca rezultat al încrucișării inductorului cu donorul.

În legătură cu solicitările tot mai insistente de accelerare a procesului de creare a hibrizilor de porumb cu însușiri programate, este imperios necesar de a majora rata de inducere a haploizilor, ameliora sistemul de gene marker care facilitează identificarea genotipurilor haploide și unele caractere importante ale liniilor inductoare.

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.

3.1.1. Îmbunătățirea capacității de inducere a haploizilor

Începând cu descendența F_2 în combinațiile hibride s-au efectuat selectarea individuală și autopolenizarea formelor cu expresie pronunțată a genelor marker, parametri morfologici cu valori maxime și eficiență de inducere înaltă (minimum 9%).

În fiecare descendență, formele cu caractere calitative și cantitative valoroase au fost implicate în încrucișări cu diferiți donori. După recoltare, pentru fiecare știulete donator polenizat s-a determinat procentul de haploizi. În calitate de martor a servit genitorul MHI, ce induce haploizi cu randament de 6-8% [63].

Haploizii s-au selectat în baza manifestării fenotipice a genei marker *RI-nj* [118, 183] ce determină pigmentarea antocianică a stratului aleuronic și scutelumului la etapa 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, astfel *RI-nj* determină pigmentarea atât a stratului aleuronic, cât și a scutelumului;

- haploide – ca rezultat al fecundării doar a nucleului central și dezvoltării endospermului triploid, gena *RI-nj* determină pigmentarea stratului aleuronic, în timp ce embrionul haploid matern rămâne nepigmentat;
- materne – ca rezultat al contaminării cu polen propriu, se obțin boabe fără pigmentația endospermului și embrionului.

Descendența F_3 (a.2008). Din 458 plante, 80 au fost selectate pentru autopolenizare și implicate în încrucișări cu donatorul – populația sintetică SPC_4 . Frecvența haploizilor a înregistrat valori în limitele 1-13,4%, genitorul MHI demonstrând un randament de 6,3%. Din totalul de plante autopolenizate, 8 – F_3 17, F_3 24, F_3 25, F_3 30, F_3 40, F_3 41(1), F_3 41(2), F_3 43, în încrucișările cu donatorul au prezentat o capacitate înaltă de inducere a plantelor haploide. Formele F_3 în populația SPC_4 au indus haploizi cu frecvență de 9,1-13,4% (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Capacitatea formelor F_3 de inducere a haploizilor în populația SPC_4

Inductor	Nr. total boabe	Nr. haploizilor	Frecvența haploizilor, %
MHI (martor)	207	13	6,3
F_3 17	174	16	9,1
F_3 24	131	13	9,9
F_3 25	105	10	9,5
F_3 30	102	11	10,7
F_3 40	208	22	10,5
F_3 41(1)	97	13	13,4
F_3 41(2)	222	26	11,7
F_3 43	167	17	10,1
Media F_3:			10,61±0,35

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 F_3 17, F_3 24, F_3 25, F_3 30, F_3 40 F_3 41(1), F_3 41(2) provin din combinația MHI × (Stock 6 × ZMS), iar F_3 43 – din combinația ZMS × (Stock 6 ×

MHI). Populația hibridă Stock 6 × (MHI × ZMS) n-a prezentat nici o formă cu caractere calitative și cantitative valoroase [7].

Descendența F₄ (a.2009). Pentru aprecierea capacității descendenței F₄ de inducere a haploizilor s-au analizat 470 plante. Pentru autopolenizare au fost selectate 174, ulterior implicate în încrucișări cu populația sintetică SPC₄×SAC₃. Frecvența haploizilor a înregistrat valori cuprinse în intervalul de 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 care au indus haploizi în populația SPC₄×SAC₃ cu frecvență ce a variat în limitele 9,2-14,8%, media lotului constituind 11,2% (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Capacitatea formelor F₄ de inducere a haploizilor în populația SPC₄×SAC₃

Inductor	Nr. total boabe	Nr. haploizilor	Frecvența haploizilor, %
MHI (martor)	164	11	6,5
F ₄ 7	209	27	12,9
F ₄ 8	168	17	10,1
F ₄ 9-1	329	40	12,2
F ₄ 9-2	213	25	11,7
F ₄ 9-3	139	19	13,6
F ₄ 40-1	113	11	9,7
F ₄ 40-2	196	29	14,8
F ₄ 42-1	163	16	9,8
F ₄ 42-2	228	23	10,1
F ₄ 44-1	119	11	9,2
F ₄ 44-2	142	13	9,2
Media F₄:			11,2±0,6

Descendența F₅ (a.2010). Aprecierea capacității de inducere a haploizilor în generația dată s-a realizat la nivel de familie. Au fost analizate 45 familii, dintre care 21 au fost selectate pentru autopolenizare și implicate ulterior în încrucișări cu populațiile sintetice SPC₄×SAC₃, SAC₃ și hibridul MK109×Ky123. La încrucișarea 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% [9, 212] (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Capacitatea familiilor F₅ de inducere a haploizilor în populația SPC₄×SAC₃

Inductor	Nr. boabelor	Capacitatea de inducere, %	Intervalul frecvenței haploizilor,%
MHI (martor)	337	6,8 ± 0,9	5,6 – 8,4
F ₅ 19	537	13,0 ± 0,9*	11,5 – 15,0
F ₅ 20	491	12,2 ± 0,9*	10,9 – 14,3
F ₅ 21	502	13,5 ± 1,8*	10,0 – 17,1
F ₅ 23	359	11,8 ± 1,6*	8,7 – 14,6
F ₅ 25	275	12,3 ± 2,2*	8,8 – 15,3
F ₅ 26	262	9,5 ± 0,1*	8,5 – 10,6
F ₅ 29	345	11,0 ± 0,9*	9,8 – 12,5
F ₅ 33	288	10,4 ± 0,8*	8,1 – 12,1
F ₅ 34	357	11,5 ± 1,2*	8,5 – 15,0
F ₅ 36	233	12,4 ± 0,5*	11,2 – 12,9
F ₅ 39	322	13,0 ± 1,0*	11,6 – 15,0
F ₅ 43	370	9,5 ± 1,2	7,9 – 11,4

* - Diferență semnificativă de MHI la nivelul $p \leq 0,05$.

Cu excepția F₅ 43, toate celelalte forme 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 (Tabelul 3.3).

Procentul plantelor haploide obținute în populația SAC₃ a pus în evidență 6 familii cu o capacitate de inducere înaltă: 9,1-11,2% 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 (Tabelul 3.4).

Un alt donor utilizat la estimarea capacității de inducere a familiilor F₅ a fost hibridul MK109×Ky123. Din totalul de familii analizate, doar F₅ 21 și F₅ 23 au prezentat un randament

mai mare de 9%, aceste familii inducând haploizi cu rată de 10,2 și 10,3%, astfel demonstrând în raport cu MHI ($4,7 \pm 0,4\%$) o eficiență mult mai pronunțată (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.4. Capacitatea familiilor F_5 de inducere a haploizilor în populația SAC_3

Inductor	Nr. boabelor	Capacitatea de inducere, %	Intervalul frecvenței haploizilor,%
MHI (martor)	217	$5,1 \pm 1,6$	3,5 – 6,7
F_5 20	205	$11,2 \pm 0,6^*$	11,1 – 11,3
F_5 21	199	$10,1 \pm 0,6^*$	8,9 – 10,7
F_5 23	297	$9,1 \pm 0,5^*$	8,7 – 10,0
F_5 27	168	$10,1 \pm 1,4^*$	8,5 – 15,4
F_5 35	148	$10,8 \pm 0,4^*$	10,0 – 11,1
F_5 38	297	$10,7 \pm 1,3^*$	9,3 – 13,0

* - Diferență semnificativă de MHI la nivelul $p \leq 0,05$.

Tabelul 3.5. Capacitatea familiilor F_5 de inducere a haploizilor în hibridul $MK109 \times Ky123$

Inductori	Nr. boabelor	Capacitatea de inducere, %	Intervalul frecvenței haploizilor,%
Control	299	$4,7 \pm 0,4$	3,9 – 5,5
F_5 ,21	326	$10,2 \pm 0,7^*$	8,5 – 11,4
F_5 ,23	194	$10,3 \pm 0,4^{**}$	9,5 – 10,5

*; ** - Diferență semnificativă de MHI la nivelul $p \leq 0,05$; 0,01, respectiv.

Deși inducerea haploizilor în primul rând depinde de genotipul utilizat ca polenizator, sursa de germoplasmă utilizată ca donor poate influența randamentul de obținere a haploizilor [96, 145, 202]. Estimarea frecvenței haploizilor pe fundalul donatorilor $SPC_4 \times SAC_3$, SAC_3 și $MK109 \times Ky123$ au confirmat acest lucru, demonstrat de media și variabilitatea ratei haploizilor pentru fiecare sistem donator x *inductor*. Astfel, maximul înregistrat pentru donatorul $SPC_4 \times SAC_3$ a constituit 17,1%, pentru SAC_3 – 15,4%, iar hibridul $MK109 \times Ky123$ – 11,4%. De asemenea, au variat considerabil și valorile ratei de inducere – 13,5; 11,2 și 10,3%, respectiv donatorilor menționați.

Testarea familiilor F_5 cu privire la inducerea haploizilor pe fundalul donatorilor $SPC_4 \times SAC_3$, SAC_3 și $MK109 \times Ky123$ 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%) (Figura 3.2).

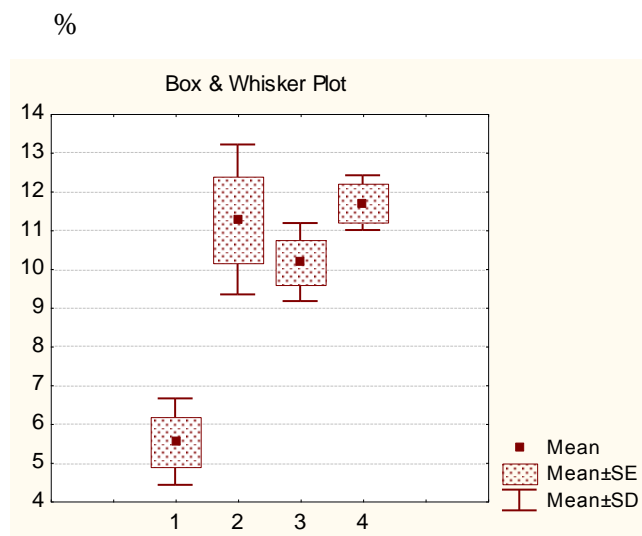


Fig. 3.2. Capacitatea familiilor F₅ de inducere a haploizilor la încrucișarea cu populațiile sintetice SPC₄×SAC₃, SAC₃ și hibridul MK109×Ky123.

Pe orizontală: 1 – MHI (martor), 2 – F₅ 21, 3 – F₅ 23, 4 – F₅ 20.

Familia F₅ 21 în încrucișările cu populațiile SPC₄×SAC₃, SAC₃ și hibridul MK109 x Ky123 a demonstrat o capacitate de inducere de 11,26%, iar F₅ 23 – 10,2%, respectiv. De asemenea și familia F₅ 20 a demonstrat eficiență înaltă în combinațiile cu populațiile SPC₄×SAC₃ și SAC₃ – 11,7%, respectiv. Deci, formele F₅ în raport cu cel mai bun genitor – MHI, au manifestat o capacitate de inducere a haploizilor semnificativ majorată. Pe lângă acest avantaj, unele familii induc eficient haploizi, indiferent 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 eficienței de inducere a formelor F₆ au fost analizate 53 familii, dintre care pentru autopolenizare s-au selectat 23. În calitate de donori destinați obținerii haploizilor s-au utilizat populația sintetică SPC₄×SAC₃ și hibridul Debiut. La obținerea haploizilor din 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%. Valorile relevate de acestea au prezentat o depășire semnificativă față de control, excepție făcând doar familia F₆ 19 (Tabelul 3.6). Datele relevă că cele mai bune rezultate au demonstrat familiile F₆ 26; F₆ 27; F₆ 28; F₆ 32; F₆ 33; F₆ 37; F₆ 39; F₆ 63 cu rata haploizilor de 10,9-12,9%, în timp ce

famiiliile F₆ 26; F₆ 28 și F₆ 32 au manifestat capacitate inductivă de 2 ori mai mare, comparativ cu cel mai bun genitor MHI.

Tabelul 3.6. Capacitatea familiilor F₆ de inducere a haploizilor în populația SPC₄×SAC₃

Inductor	Nr. boabe	Capacitatea de inducere, %	Intervalul frecvenței haploizilor,%
MHI (martor)	270	6,3 ± 0,6	5,5 – 7,4
F ₆ 19	225	9,8 ± 1,2	9,6 – 11,5
F ₆ 26	518	12,9 ± 0,9**	9,9 – 16,0
F ₆ 27	515	12,5 ± 0,8**	9,0 – 13,6
F ₆ 28	476	12,5 ± 0,1**	10,4 – 14,1
F ₆ 29	555	12,3 ± 1,0**	10,9 – 15,0
F ₆ 30	377	10,9 ± 1,3*	8,2 – 14,4
F ₆ 32	350	12,8 ± 2,3**	9,0 – 17,3
F ₆ 33	291	10,6 ± 0,2**	10,3 – 10,9
F ₆ 36	187	10,9 ± 1,3*	8,9 – 12,9
F ₆ 37	271	11,7 ± 0,4**	11,1 – 12,2
F ₆ 38	245	10,3 ± 1,0*	8,9 – 11,8
F ₆ 39	160	11,8 ± 1,5*	9,2 – 15,5
F ₆ 43	203	9,9 ± 1,3*	7,4 – 11,1
F ₆ 63	374	11,6 ± 1,5**	8,6 – 14,3

*, ** - Diferență semnificativă de MHI la nivelul $p \leq 0,05$; 0,01, respectiv.

Un alt donor utilizat la estimarea capacității familiilor F₆ de inducere a haploizilor a fost hibridul Debiut. Linia MHI, în încrucișarea cu acest donor a demonstrat un randament de 5,8%. Din totalul de familii – 8 au manifestat o eficiență de inducere de 9,2-11,4%, ceea ce prezintă un avantaj evident în raport cu MHI (Tabelul 3.7).

Comparativ cu populația SPC₄×SAC₃, pe fondalul căreia s-au obținut haploizi cu frecvență maximă de 17,3%, cu acest donor cea mai înaltă valoare a constituit 16%. Faptul că rata haploizilor diferă la diferiți donori, permite identificarea formelor inductoare relativ stabile, comparativ cu genitorii.

Tabelul 3.7. Capacitatea familiilor F₆ de inducere a haploizilor la încrucișarea cu hibridul Debiut

Inductor	Nr. boabe	Capacitatea de inducere, %	Intervalul frecvenței haploizilor, %
MHI (martor)	413	5,8 ± 0,8	5,0 – 8,0
F ₆ 19	405	9,4 ± 0,1**	9,0 – 10,0
F ₆ 26	417	12,7 ± 2,1**	10,0 – 16,0
F ₆ 27	255	8,6 ± 0,5*	8,0 – 10,0
F ₆ 28	286	8,7 ± 0,1**	8,0 – 9,0
F ₆ 29	237	9,2 ± 0,6*	8,0 – 10,0
F ₆ 30	495	10,3 ± 0,8*	9,0 – 13,0
F ₆ 32	140	11,4 ± 0,8**	10,0 – 12,0
F ₆ 33	327	11,3 ± 1,1*	10,0 – 13,0
F ₆ 36	150	10,1 ± 0,9*	8,0 – 11,0
F ₆ 38	160	7,5 ± 0,2*	7,0 – 9,0
F ₆ 63	113	10,6 ± 0,8*	9,0 – 11,0

*; ** - Diferență semnificativă față de MHI la nivelul $p \leq 0,5; 0,01$, respectiv.

Analiza comparativă a capacității medii de inducere a haploizilor, manifestată de unele familii F₆ pe fondalul 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%.

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 fiind doar F₅ 29, la care $\sigma=2,19$ (Figura 3.3).

La mod general, analiza capacității medii de inducere a haploizilor tuturor formelor în diferite descendențe implicate în testare, comparativ cu martorul MHI a demonstrat o majorare considerabilă pentru F₅ și F₆. Posibil, că aceasta s-a datorat selecției eficiente a formelor valoroase în generația F₄ (Tabelul 3.8).

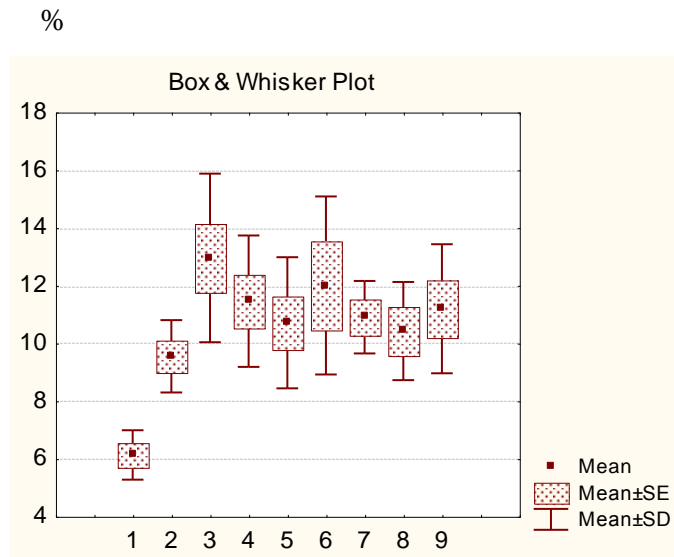


Fig. 3.3. Capacitatea familiilor F₆ de inducere a haploizilor la încrucișarea cu populația sintetică SPC₄×SAC₃ și hibridul Debiut.

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.

Tabelul 3.8. Capacitatea de inducere a haploizilor de inductorii de diferite generații

Generație	An	Sursă donatoare	Rata haploizilor, %	
			Formă inductoare	Linia MHI
F ₃	2008	SPC ₄	4,3	6,3
F ₄	2009	SPC ₄ ×SAC ₃	4,4	6,5
F ₅	2010	SPC ₄ ×SAC ₃	6,9	6,8
		SAC ₃	6,1	5,1
		MK109×Ky123	4,8	4,7
F ₆	2011	SPC ₄ ×SAC ₃	7,7	6,3
		Hibridul Debiut	6,1	5,8

Prin selectare individuală în generațiile F₄ ... F₆, a plantelor provenite din încrucișarea liniilor inductoare cunoscute Stock 6, ZMS și MHI, 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 sintezei antocianului),

urmată de autopolenizare s-au obținut noi forme de inductori ce manifestă eficiență înaltă de inducere a haploizilor materni; unele au depășit de 2 ori cel mai bun genitor – MHI; altele pe fondalul diferiților donori au indus haploizi cu rată mai înaltă de 9%.

Familiile de inductori F₆ creați, ce depășesc linia MHI după capacitatea de inducere a haploizilor, demonstrează faptul că selectarea dintre acestea a noilor inductori vor demonstra doar avantaje la obținerea boabelor cu embrion haploid din divers material cu valoare genetică și ameliorativă.

3.1.2. Analiza variației genetice a capacității de inducere a haploizilor

Conform rezultatelor cercetării descendenței F₃ (2008), combinația hibridă Stock 6×(MHI×ZMS) s-a diferențiat de MHI×(ZMS×Stock 6) și ZMS×(MHI×Stock 6) prin capacitate redusă de inducere a haploizilor și lipsa variației genetice (Tabelul 3.9).

Tabelul 3.9. Variația genetică a capacității de inducere a haploizilor în diferite combinații hibride

Combi-nație hibridă	Rata haploizilor, %	$\sigma_{\text{generală}}$	$\sigma_{\text{aleatorie}}$	$\sigma_{\text{genetică}}$	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) indică faptul, că genele ce controlează capacitatea de inducere a haploidiei la liniile MHI și ZMS au fost blocate de către linia 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 nivelul variației genetice pentru caracterul dat. Semnificația variației genetice s-a determinat după criteriul Fisher, care indică de câte ori variația depistată între diferite plante din aceeași combinație o depășește pe cea teoretică (Tabelul 3.9).

După o autopolenizare, din cele trei combinații hibride în cercetare a rămas doar MHI×(ZMS×Stock 6). Descendența F₄ a prezentat o valoare medie a capacității de inducere de 4,4% și variație genetică – 1,7%. Descendența a inclus 25 de plante, ceea ce a permis contruirea histogrammei de repartiție a acestora în baza capacității de inducere a haploidiei (Figura 3.4).

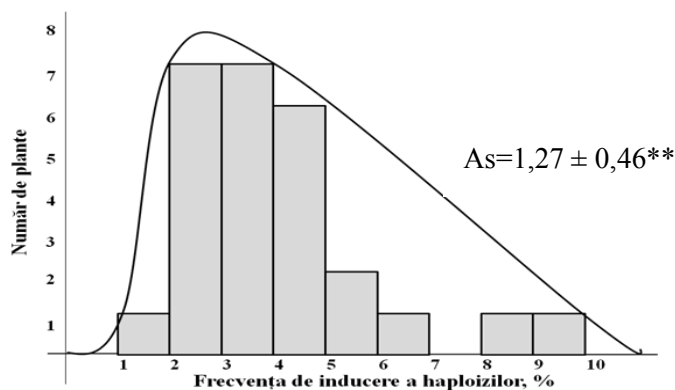


Fig. 3.4. Repartizarea formelor F₄ din combinația MHI×(ZMS×Stock 6) în baza capacității de inducere a haploizilor.

Repartizarea plantelor F₄ după capacitatea de inducere s-a dovedit a fi asimetrică, cu înclinare spre stânga față de mediană. Coeficientul asimetriei a constituit $1,27 \pm 0,46^*$ ($p \leq 0,01$). Repartizarea asimetrică poate fi explicată prin acțiunea multipă a genelor, când efectele diferiților loci la combinarea într-un genotip nu se sumează, ci se înmulțesc. Spre exemplu, dacă fiecare din două gene depășesc valoarea caracterului de două ori, atunci împreună vor depăși de 4 ori. Această ipoteză se controlează prin transformare logaritmică, metodă care a demonstrat că coeficientul asimetriei a constituit $0,26 \pm 0,46$. Valoarea obținută este mai mică decât eroarea, ceea ce demonstrează, că asimetria dispore.

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 3.5).

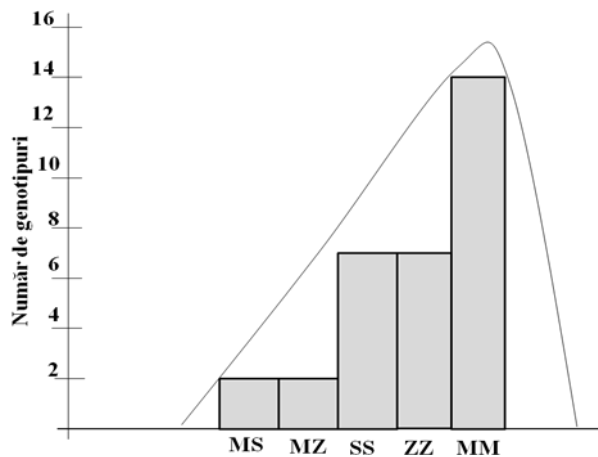


Fig. 3.5. Repartizarea formelor F₄ din combinația MHI×(ZMS×Stock 6) în baza frecvenței genotipice.

În general, repartizarea asimetrică denotă faptul, că indicii progresului de selecție cu fiecare autopolenizare pot varia. Spre exemplu, următoarea generație poate depăși descendența anterioară, sau invers. La determinarea capacității de inducere medie per descendență s-au obținut următoarele valori: F₄ – 4,4%; F₅ – 6,9%; F₆ – 7,7%. Deci, progresul general de selecție a constituit 1-2% per an. Analiza pedigreeului a demonstrat, că inductorii F₆ cu capacitate înaltă de inducere a haploizilor provin din 3 plante F₄ și 4 familii F₅, respectiv (Figura 3.6).

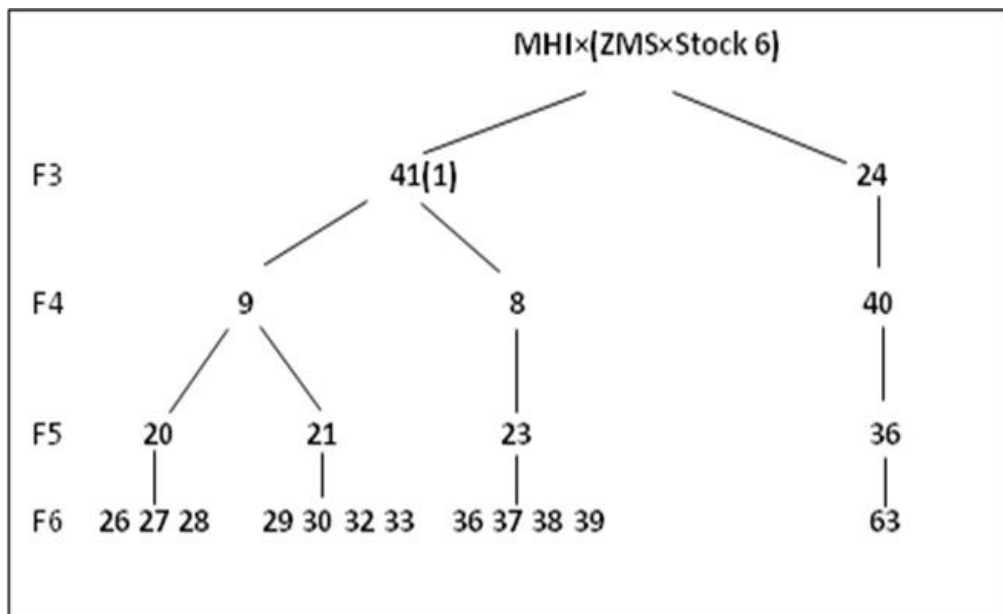


Fig. 3.6. Reprezentarea schematică a originii inductorilor F₆ cu capacitate de inducere a haploizilor înaltă din combinația hibridă MHI×(ZMS×Stock 6).

În tabelul 3.10 este prezentată capacitatea medie a familiilor F₅ și F₆ care au derivat din plantele F₄ (cu valori maxime ale mediei per plantă) provenite din combinația hibridă MHI×(ZMS×Stock 6), cât și corelația între acestea. Astfel, s-a constatat că familiile de inductori F₅ provenite din F₄. 8 (6,8%) au prezentat o rată medie de 9,3%, demonstrând un progres al selecției de 2,5%. La familiile provenite din F₄. 9 (5,9%) s-a constatat o rată de 9,9%, și un progres de 4%, iar la cele din F₄.40 (8,5%) – 9,1% și 0,4%, respectiv.

Valorile ratei haploizilor de 9,3; 10,2 și 10,7% la F₆ denotă un progres al selecției ceva mai redus comparativ cu descendența F₅ – 0%, 0,3% și 1,6%. În ceea ce privește corelațiile capacității de inducere între frecvența maximă și media per plantă în F₄ s-a constatat o corelație medie; $r = 0,51$. Între capacitatea de inducere F₅ și capacitatea de inducere F₆ s-a depistat o corelație slabă: $r = -0,08$ (Tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Capacitatea de inducere a haploizilor la formele F₄, F₅, F₆ din combinația hibridă MHI×(ZMS×Stock 6) și corelația între acestea (%)

Forme	F ₄ (2009)		F ₅ (2010)	F ₆ (2011)
	Frecvența maximă, %	Media per plantă,	Media per familie	Media per familie
F ₄ .8	10,1	6,8	9,3	9,3
F ₄ .9	8,9	5,9	9,9	10,2
F ₄ .40	9,7	8,5	9,1	10,7
Corelații:	0,51		-0,08	

3.1.3. Consolidarea sistemului genetic de identificare a haploizilor

O etapă importantă la inducerea haploizilor materni *in vivo* prezintă identificarea boabelor cu embrion haploid în descendența F₁, rezultate din încrucișarea inductorului cu genotipul matern (donor). Inductorul posedă gene marker ce controlează sinteza pigmentului antocianic, expresia cărora are o pronunțată specificitate tisulară, organică și ontogenetică. Unul din obiectivele cercetărilor a constituit combinarea genelor antocianice *R1-nj*, *B1*, *Pl1* într-un singur sistem în scopul optimizării procesului de selectare a boabelor cu embrion haploid *in vivo*. În acest fel, unul din principalele criterii de selecție a formelor valoroase a constituit colorația determinată de expresia markerilor antocianici la diferite faze de dezvoltare.

Dintre genele antocianice, cea mai amplă utilizare la identificarea haploizilor se constată pentru *RI-nj* (*RI-Novajo*) [88]. În combinație cu alte gene dominante ce controlează sinteza antocianului (*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C1* și *C2*), gena *RI-nj* determină pigmentație în stratul aleuronic, cât și scutelum în boabele uscate. Ca rezultat, al polenizării donorului cu inductorul ce conține acest marker, embrionul matern haploid este nepigmentat, iar endospermul triploid derivat din 2 genomuri - matern și patern, este pigmentat [111, 195] (Figura 3.7).

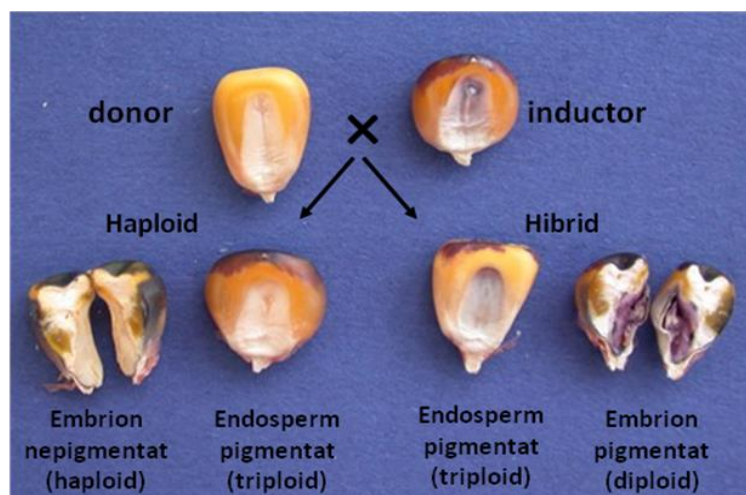


Fig. 3.7. Expresia genei *RI-nj* în boabele haploide și diploide.

Genă *RI-nj* în calitate de marker embrionar și endospermal a devenit un factor important la identificarea haploizilor. Colorația din embrion și endosperm permite selectarea eficientă și ușoară a boabelor cu embrion haploid. În prezent majoritatea inductorilor conțin această genă în calitate de marker-reper. La crearea noilor linii, gena reprezintă de asemenea principalul marker de identificare a haploizilor [118, 183].

Gena *RI-nj* este prezentă în toate trei linii inițiale, utilizate ca material la crearea inductorilor. Totuși extinderea și intensitatea pigmentului în fiecare din acestea este diferită, ceea ce este o dovadă că expresia genei depinde de fondalul genetic, adică este supusă 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 formelor F_6 , spre deosebire de formele inițiale determină o pigmentație mai accentuată în boabele uscate (Figura 3.8).

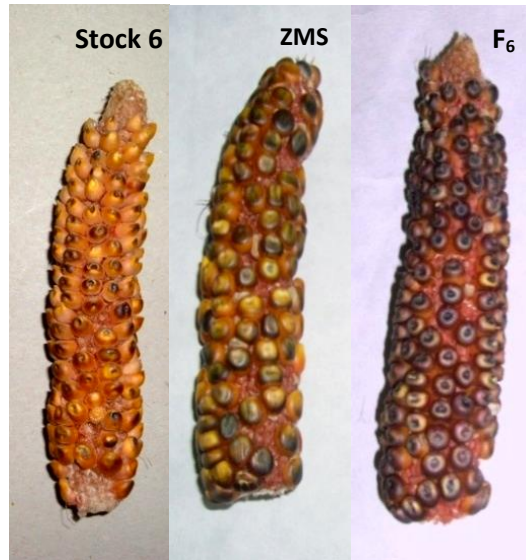


Fig. 3.8. Expresia genei *RI-nj* în boabele uscate ale liniei A464, ca rezultat al polenizării cu diferiți inductori.

Odată cu mărirea spectrului de utilizare a plantelor haploide, s-a constatat, că unele surse donatoare influențează expresia genei *RI-nj* [89, 111].

Pigmentarea antocianică în endosperm și embrion, în dependență de donator variază în intensitate și extindere ceea ce relevă rolul factorului matern în expresia genelor ce controlează sinteza pigmentului (Figura 3.9).

De altfel, pigmentarea în aleuronă și scutelum poate lipsi, dacă genotipul donator (porumb cu bob sticlos) conține genele inhibării sintezei antocianului cum ar fi *C1-I*, *C2-Idf*, *In1-D* [88, 96].

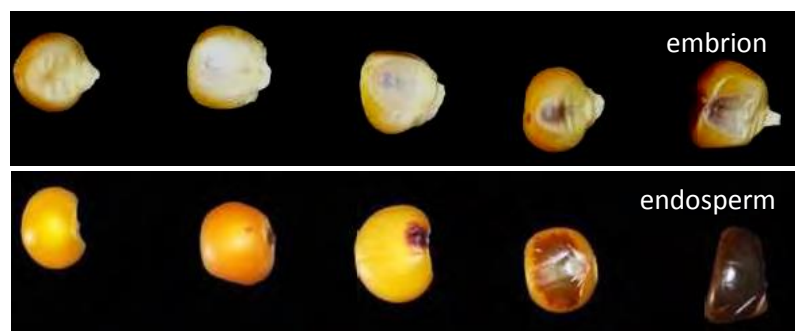


Fig. 3.9. Expresia genei *RI-nj* la boabele uscate – variația intensității și extinderii pigmentării antocianice în dependență de sursa donatoare.

Din asemenea material, boabele haploide sunt practic imposibil de selectat vizual, deoarece absolut nu se deosebesc de cele maternelor. Ca soluție ar putea servi metodele citologice care sunt, totuși, destul de laborioase.

Strategia de bază a cercetărilor noastre la aspectul vizat a constat în consolidarea și eficientizarea sistemului de gene marcatore ale antocianului prin combinarea genelor *BI* (*Booster 1*) și *PII* (*Purple1*) în același sistem marker cu *RI-nj*, sistem care ar soluționa problema dificultății de identificare sau a excluderii nejustificate a bobelor haploide.

Markerii *BI* și *PII* determină sinteza antocianului în sistemul radicular la faza de plantule de 3-4 zile și de plante mature [87]. În prezența acestor gene, sistemul radicular al diploizilor capătă colorație roșietică (1), iar planta matură – purpurie (2) (Figura 3.10).



Fig. 3.10. Expresia genelor *BI* și *PII* la faza de plantule de 3-4 zile (1) și plante mature (2).

Pentru expresia markerilor este necesară prezența ambelor gene; *BI* controlează sinteza intensă a antocianului, *PII* – pigmentarea, independentă de prezența/absența luminii solare [87]. Astfel, o atenție deosebită în procesul combinării genelor *BI* și *PII* s-a acordat selectării plantelor cu cea mai intensă pigmentare antocianică în țesuturile vegetale (Figura 3.11).



Fig.3.11. Plante inductor cu pigmentare antocianică intensă (A) și fără pigmentare (B).

Pentru analiza expresiei genelor *BI* și *PII* în sistemul radicular, s-a încrucișat o formă maternă, ce inhibă sinteza antocianului în endosperm și embrion cu o formă paternă – F_6 . Boabele din descendența F_1 au fost germinate până la apariția coleoptilului. S-a constatat că sistemul radicular la plantulele diploide posedă 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 (Figura 3.12).

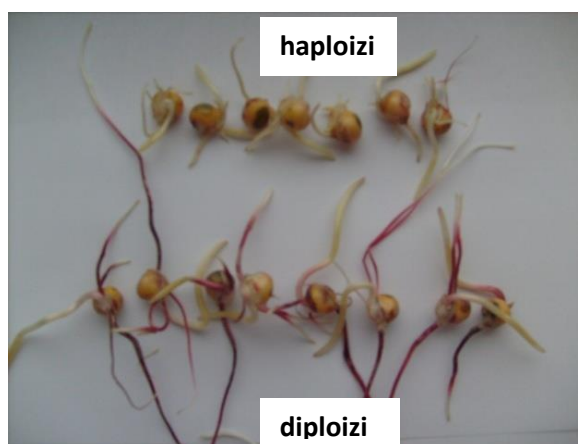


Fig. 3.12. Diferența de expresie a genelor *BI* și *PII* la plantulele haploide și hibride, la faza de 3-4 zile.

Aprecierea gradului de pigmentare a antocianului 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*. Cu atât mai mult, că identificarea se realizează ușor și exact. Sistemul marker ce conține genele *RI-nj*, *BI* și *PII* într-adevăr soluționează problema selectării haploizilor din diferite tipuri de material. Prezența acestor gene în sistemul marker al inductorilor sporește eficiența indentificării haploizilor materni.

3.1.4. Ameliorarea caracterelor cantitative la liniile cu capacitate de inducere a haploizilor

Marea majoritate a liniilor cu capacitate de inducere a haploizilor se caracterizează prin talie mică a plantei, din care cauză 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.

În fiecare descendență, paralel cu selectarea plantelor cu expresie bună a genelor *BI* și *PII*, se selectau și cele ale căror indici morfologici aveau valori maxime. Dintre genitori, MHI se caracterizează prin parametri cantitativi bine ameliorați. Inductorii din generațiile F_5 și F_6 au fost testați prin compararea cu genitorii Stock 6, ZMS și MHI.

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 la 16,4 la 22,3 cm (Tabelul 3.11).

Linia ZMS cu înălțimea plantei de 125,5 cm a fost depășită semnificativ de majoritatea familiilor testate, cu excepția F_5 43, iar Stock 6 – 144,5 cm, a fost depășită de 4 familii – F_5 23, F_5 25, F_5 26 și F_5 27, cu valori de la 154,1 la 164,0 cm. MHI, cu înălțimea de 160,6 cm nu a fost depășită semnificativ de nici una din familiile menționate.

În ce privește lungimea paniculului, linia ZMS cu indici de $13,0 \pm 1,0$ cm a fost depășită semnificativ de majoritatea familiilor, cu excepția F_5 36 și F_5 38 – 16,4-16,6 cm. Stock 6, cu lungimea paniculului de 19,3 cm a fost semnificativ inferior în raport cu 3 familii – F_5 19, F_5 20, F_5 26 care au prezentat valori de 21,3-22,6 cm.

Tabelul 3.11. Înălțimea plantei și lungimea paniculului la familiile F₅ de inductori

Inductori	Înălțimea plantei, cm	Lungimea paniculului, cm
Linia ZMS	125,5 ± 0,4	13,0 ± 1,0
Linia Stock 6	144,5 ± 0,6	19,3 ± 0,4
Linia MHI	160,0 ± 0,5	21,8 ± 0,9
F ₅ 19	151,3 ± 3,1 ^{***}	21,3 ± 0,4 ^{***^}
F ₅ 20	143,0 ± 1,0 ^{***}	21,3 ± 0,4 ^{***^}
F ₅ 21	141,2 ± 1,6 ^{***}	20,7 ± 1,7 [*]
F ₅ 23	159,0 ± 1,2 ^{***^^}	21,0 ± 1,5 [*]
F ₅ 25	164,5 ± 1,1 ^{***^^^}	21,5 ± 1,0 ^{**}
F ₅ 26	154,1 ± 1,3 ^{***^^}	22,6 ± 0,8 ^{***^}
F ₅ 27	164,0 ± 0,7 ^{***^^^}	22,5 ± 1,8 [*]
F ₅ 29	143,3 ± 1,3 ^{***}	20,3 ± 1,1 [*]
F ₅ 33	137,5 ± 1,8 ^{***}	17,5 ± 1,8 [*]
F ₅ 35	147,5 ± 1,8 ^{**}	22,5 ± 1,8 [*]
F ₅ 36	138,6 ± 1,3 ^{***}	16,4 ± 0,6
F ₅ 38	138,8 ± 1,4 ^{***}	16,6 ± 0,9
F ₅ 39	142,5 ± 1,8 ^{***}	22,3 ± 1,5 [*]
F ₅ 43	136,6 ± 4,5	18,0 ± 2,0 [*]

*, **, *** diferență semnificativă de ZMS, p≤0,05; 0,01; 0,001, respectiv.

^, ^^, ^^ ^ diferență semnificativă de Stock 6, p≤0,05; 0,01; 0,001, respectiv.

MHI, cu lungimea paniculului de 21,8 cm nu a fost depășit semnificativ de nici o familie cu capacitate înaltă de inducere a haploizilor. Rezultatele demonstrează, că plantele din familiile F₅ cu rată a haploizilor înaltă s-au evidențiat și prin indici morfologici mai majorați decât genitorii ZMS și Stock 6. Nici una din familiile de interes nu a înregistrat valori mai înalte decât MHI [212].

În descendența F₆, cele 12 familii cu capacitate de inducere înaltă – F₆ 26, F₆ 27, F₆ 28, F₆ 29, F₆ 30, F₆ 32, F₆ 33, F₆ 36, F₆ 37, F₆ 38, F₆ 39, F₆ 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 (Tabelul 3.12).

Datele despre înălțimea plantei au prezentat indici semnificativ mai înalți comparativ cu linia ZMS, cu valoarea medie de 127,7 cm pentru majoritatea familiilor. Excepție au făcut doar plantele din familia F₆ 27 cu media de 135,6 cm.

Tabelul 3.12. Înălțimea plantei și lungimea paniculului la familiile F₆ de inductori

Inductori	Înălțimea plantei, cm	V, %	Lungimea paniculului, cm	V, %
Linia ZMS	127,7 ± 1,0	1,4	14,3 ± 0,7	10,8
Linia Stock 6	155,3 ± 1,9	1,6	20,5 ± 1,0	4,9
Linia MHI	167,0 ± 1,0	1,2	23,5 ± 0,5	4,3
F ₆ 26	145,0 ± 1,7 ^{**}	2,0	23,6 ± 1,4 [*]	10,1
F ₆ 27	135,6 ± 1,7	2,8	19,8 ± 0,3 ^{**}	3,6
F ₆ 28	141,3 ± 1,9 ^{**}	2,7	22,5 ± 1,3 ^{**}	11,1
F ₆ 29	141,7 ± 2,3 ^{^^}	3,9	20,2 ± 0,8 [*]	9,3
F ₆ 30	145,0 ± 1,9 ^{^^^}	2,3	21,7 ± 1,3 [*]	10,2
F ₆ 32	147,3 ± 1,1 ^{^^^}	1,2	21,7 ± 0,6 ^{**}	5,1
F ₆ 33	142,2 ± 1,5 ^{**}	2,4	21,2 ± 1,0 ^{**}	10,6
F ₆ 36	165,5 ± 3,2 ^{**}	2,7	22,5 ± 1,3 [*]	11,1
F ₆ 37	168,3 ± 2,6 ^{^^^}	2,6	21,3 ± 0,6 ^{**}	5,2
F ₆ 38	172,4 ± 2,2 ^{^^^}	3,9	23,4 ± 0,7 ^{^^^}	8,7
F ₆ 39	176,5 ± 2,1 ^{^^^}	3,9	24,5 ± 1,0 ^{^^^}	11,1
F ₆ 63	168,8 ± 2,4 ^{^^^}	3,2	24,3 ± 0,8 ^{^^^}	7,1

*, **, *** diferență semnificativă de ZMS, $p \leq 0,05; 0,01; 0,001$, respectiv.

^, ^^, ^^ ^ diferență semnificativă de Stock 6, $p \leq 0,05; 0,01; 0,001$, respectiv.

Comparativ cu Stock 6, indici mai înalți au demonstrat 6 familii – F₆ 30, F₆ 32, F₆ 37, F₆ 38, F₆ 39, F₆ 63, iar cu MHI (167,0 cm), ameliorare semnificativă a parametrului a demonstrat familia F₆39 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 F₆ 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 F₆ 38, F₆ 39, F₆ 63. La nici una din familiile de interes nu s-au atestat valori semnificativ mai înalte ale lungimii paniculului în raport cu MHI. Coeficientul de variație a înălțimii plantei și lungimii paniculului la liniile F₆, a variat între 1,2-3,9% și 3,6-11,1%, respectiv, ceea ce relevă variații ne semnificative pentru caracterele ameliorate, fenomen care posibil se datorează homozigoției genotipului.

În cercetările prezentate au fost încrucișați inductori ce diferă considerabil conform înălțimii plantei și lungimii paniculului. Chiar dacă frecvența de inducere și expresia genelor marker au constituit principalele criterii de selecție, este important că unele dintre familiile F₆ 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 F₅ a constituit 0,77* (p≤0,05), iar la inductorii F₆ – 0,72* (p≤0,05). Aceasta demonstrează că plantele cu înălțime mai mare au și un panicul mai lung. Prin analiză regresională s-au stabilit ecuațiile matematice ale dependenței: $y = (-8,6528 + 0,1949) \times x$ (Figura 3.13 A) și $y = (3,5508 + 0,1182) \times x$ (Figura 3.13 B).

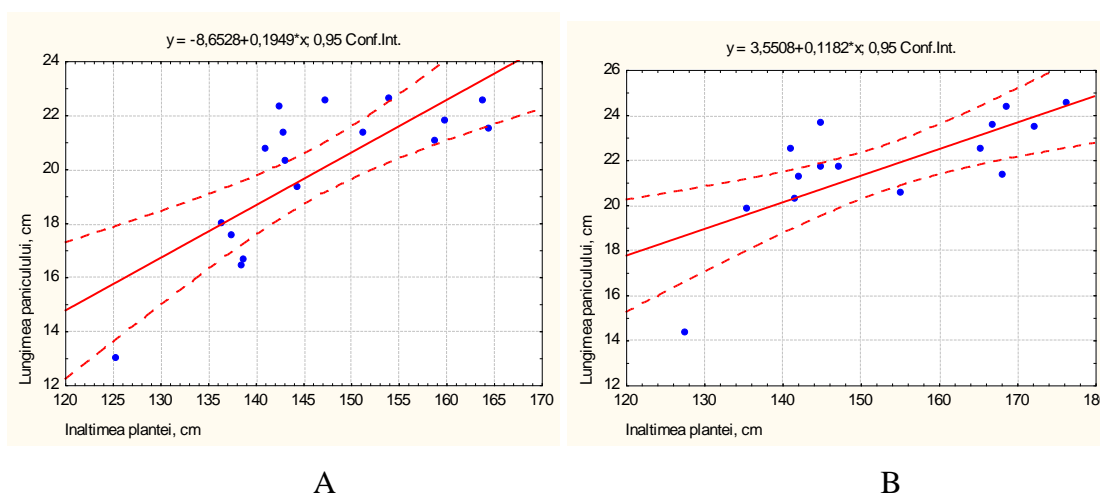


Figura 3.13. Dependența regresională între lungimea paniculului (y) și înălțimea plantei (x) la liniile inductoare de haploidie F₅ (A) și F₆ (B).

În baza ecuațiilor în care y – lungimea paniculului, iar x – înălțimea plantei, 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 care s-au abătut de la tendința generală – curba teoretică sau intervalul de confidență, relevă faptul că deși la mod general există o corelație pozitivă între înălțimea plantei și lungimea paniculului, printre genotipurile testate există linii care au înălțimea relativ mică, dar lungimea paniculului – mare. Aceasta se referă la liniile F₆ 26 și F₆ 28.

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 tabelul 3.13 sunt prezentate

datele cu privire la aceste caractere, la familiile cu capacitate de inducere înaltă. Astfel, în descendența F₆ plantele au produs zilnic o cantitate de polen de 0,188-0,318 g, pe durată de înflorire 3-5 zile. În comparație cu una din liniile inițiale - MHI care totodată este și cea mai performantă, toate familiile ameliorate au produs mai mult polen. 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 analizat variind în limitele 0,256-0,318 g (Tabelul 3.13).

Tabelul 3.13. Cantitatea zilnică de polen per plantă și perioada înflorii paniculului la familiile F₆ cu capacitate de inducere înaltă

Inductori	Cantitatea de polen per plantă, g	Durata înfloririi paniculului, zile
Linia ZMS	0,056 ± 0,100	3
Linia Stock 6	0,107 ± 0,007	3
Linia MHI	0,142 ± 0,011	4
F ₆ 26	0,211 ± 0,017 ^{**^}	5
F ₆ 27	0,257 ± 0,009 ^{***^^*}	4
F ₆ 28	0,256 ± 0,007 ^{**^*}	4
F ₆ 29	0,297 ± 0,036 ^{**^^*}	5
F ₆ 30	0,236 ± 0,027 ^{**}	5
F ₆ 32	0,318 ± 0,009 ^{***^^*}	5
F ₆ 33	0,301 ± 0,026 ^{***^}	5
F ₆ 36	0,231 ± 0,010 ^{**^}	5
F ₆ 37	0,188 ± 0,023 [*]	4
F ₆ 38	0,198 ± 0,010 ^{**}	4
F ₆ 39	0,204 ± 0,100 [*]	5
F ₆ 63	0,234 ± 0,006 ^{**^*}	5

*, **, *** diferență semnificativă de ZMS, p≤0,05; 0,01; 0,001, respectiv.

^, ^^, ^^ ^ diferență semnificativă de Stock 6, p≤0,05; 0,01, respectiv.

** diferență semnificativă de MHI, p≤0,05; 0,01, respectiv.

Dendrograma de repartiție a liniilor inductoare F₆ (Figura 3.14), 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 – F₆26, 8 – F₆30, 9 – F₆32, 5 – F₆27, 6 – F₆28, 7 – F₆29, 10 – F₆33, iar cu MHI: 11 – F₆

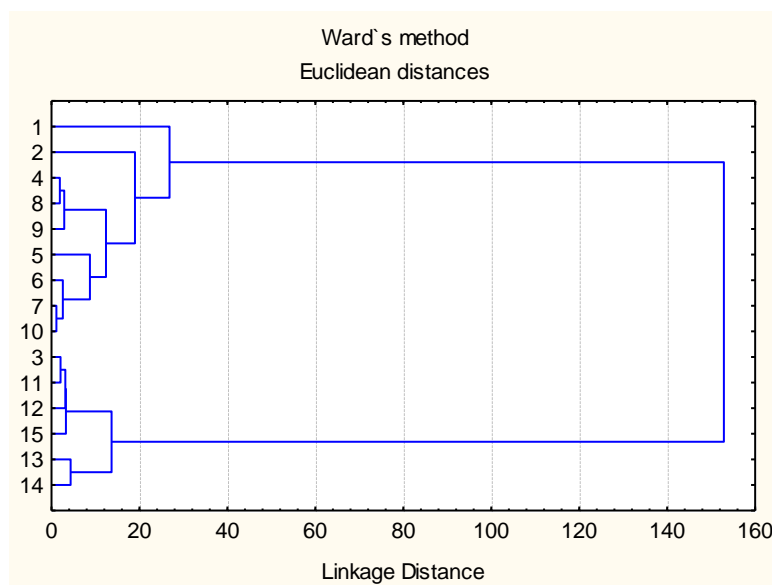


Figura 3.14. Analiza clusteriană a inductorilor creați F₆ în baza similitudinii unor caractere cantitative și morfobiologice.

1 – ZMS, 2 – Stock 6, 3 – Linia MHI, 4 – F₆26, 5 – F₆27, 6 – F₆28, 7 – F₆29, 8 – F₆30, 9 – F₆32, 10 – F₆33, 11 – F₆36, 12 – F₆37, 13 – F₆38, 14 – F₆39, 15 – F₆63.

36, 12 – F₆37, 15 – F₆63, 13 – F₆38, 14 – F₆39, care au prezentat valori înalte ale indicilor incluși în studiu [213]. Astfel, media valorilor 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, pentru înălțimea plantelor, lungimea paniculului, cantitatea de polen, durata înfloririi.

Prin analiză clusteriană în baza metodei *k*-mediilor (conform valorilor/nivelului “mare”, “mediu”, “mic”) care permite o clasificare mai exactă a obiectelor de studiu [18] s-a constatat că în clusterelor 1, 2, 3 liniile analizate s-au repartizat după cum urmează: 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 – clusterul 1; 1, 5 – clusterul 2; 3, 11, 12, 13, 14, 15 – clusterul 3.

Analiza varianței intra- și interclusteriene a demonstrat că cea mai înaltă capacitate de diferențiere a clusterelor a manifestat *înălțimea plantei*, după care a urmat *lungimea paniculului* și *durata de înflorire*. Cantitatea de polen n-a prezentat un indiciu relevant pentru diferențierea clusterelor, deci și a genotipurilor (Tabelul 3.14).

Conform datelor din tabelul 3.14, clusteretele liniilor inductoare de haploidie, manifestă, totuși, avantaje diferite. De exemplu, liniile din clusterul 3 au valori mai înalte ale înălțimii plantei și lungimii paniculului, dar ușor cedează liniilor din clusterul 1 în ceea ce privește cantitatea de polen și durata înfloririi.

Tabelul 3.14. Analiza clusteriană a k -mediilor liniilor F_6 , inductoare de haploidie

Caracter	Varianța		F	p
	interclusteriană	intraclusteriană		
Înălțimea plantei	2997,929	255,100	70,51	0,00
Lungimea paniculului	57,679	30,394	11,39	0,00
Cantitatea de polen	0,015	0,057	1,60	0,24
Durata de înflorire	1,886	5,714	1,98	0,18

Totuși, liniile 11, 12 – F_6 36 și F_6 39 din clusterul 3, demonstrează performanță înaltă în special în ceea ce privește primele 2 caractere, iar liniile F_6 32 și F_6 33 – în ceea ce privește cantitatea de polen și durata înfloririi paniculului (Tabelul 3.15).

Tabelul 3.15. Media (\bar{x}) și varianța (S) caracterelor în clusteretele liniilor inductoare F_6

Caracter	Clusterul 1		Clusterul 2		Clusterul 3	
	\bar{x}	S	\bar{x}	S	\bar{x}	S
Înălțimea plantei	145,40	23,780	131,65	31,205	169,75	16,243
Lungimea paniculului	21,63	1,359	17,05	15,125	23,25	1,423
Cantitatea de polen	0,25	0,005	0,16	0,020	0,20	0,001
Durata înfloririi	4,57	0,619	3,50	0,500	4,50	0,300

Referitor la durata de înflorire, toate familiile de interes au demonstrat o perioadă de minimum 4 zile, iar la F_6 .26, F_6 .29, F_6 .30, F_6 .32, F_6 .36, F_6 .39, F_6 .63 paniculul a produs polen timp de 5 zile.

Rezistența plantelor la cădere și sterilitatea masculină parțială. În procesul obținerii haploizilor, inductorii uneori demonstrează dezavantaje: unii sunt sensibili la cădere, alții dezvoltă paniculi cu sectoare sterile. Din atare motiv, în cercetările noastre s-a propus

ameliorarea caracterelor menționate la inductorii creați, pentru asigurarea eficienței și durabilității acestora.

În fiecare descendență, paralel cu criteriile de selecție de bază – frecvența de inducere, expresia genelor marker, indicii morfologici, plantele de interes s-au selectat și în baza rezistenței la cădere și fertilității masculine.

În ce privește căderea plantelor, caracterul a fost evident în descendența F_6 . În cadrul familiilor $F_{6,26}$, $F_{6,27}$, $F_{6,28}$, 8-15% de plante au demonstrat sensibilitate (Figura 3.15), iar celelalte plante din familia de inductori $F_6 26$ s-au evidențiat prin rezistență sporită la cădere.



Fig. 3.15. Plante din familia $F_6 26$, căzute.

După cum s-a menționat, familiile $F_6 26$, $F_6 28$ au prezentat indici favorabili ai înălțimii plantelor, lungimii paniculului și cantității de polen (Tabelul 3.12, 3.13). Faptul că unele plante din cadrul acestor familii se pătulesc, relevă că selectarea plantelor cu talie înaltă, urmează a fi realizată cu prudență pentru a nu selecta în paralel și genotipuri predispuse la cădere.

În ceea ce privește sterilitatea parțială a gametofitului masculin, la unii inductori, precum e și firesc fenomenul influențează cantitatea și calitatea polenului, și desigur randamentul boabelor per știulete, acesta semnalându-se și la linia inițială MHI (Figura 3.16 A).

S. Chalyk și colab. (2003), au depistat la unii inductori frecvență înaltă de celule aneuploide. Autorii au concluzionat, că fenomenul poate cauza formarea boabelor haploide și

determina iregularități în timpul meiozei, influențând atât sterilitatea masculină parțială, cât și randamentul redus al boabelor pe știulete [66].

Sterilitatea masculină parțială este ușor observată vizual - unele antere nu se deschid și nu produc polen. Primele depistări ale caracterului dat au fost în generația F₆, formele cu segmente sterile pe panicul fiind excluse din cercetare. Totuși, în cea mai mare parte, inductorii F₆ cu expresie pronunțată a genelor marker și capacitate de inducere înaltă au dezvoltat panicul cu polen totalmente fertil (Figura 3.16 B).

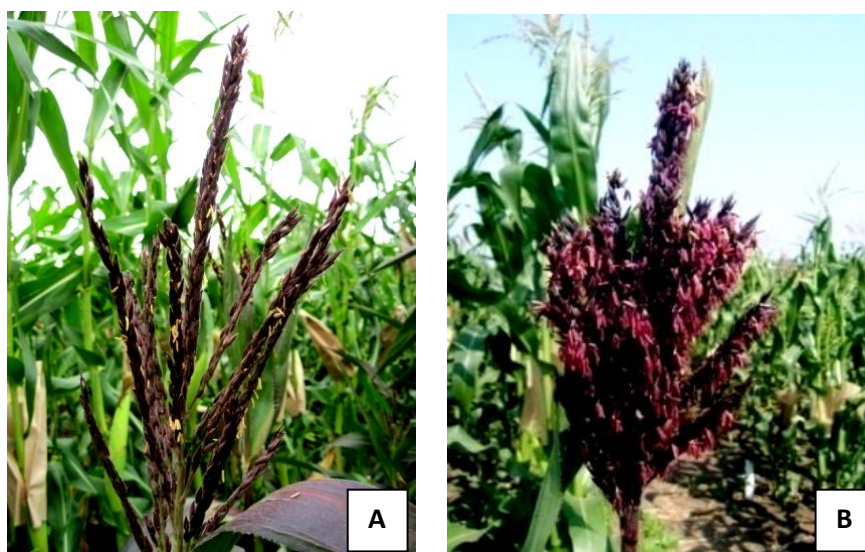


Fig. 3.16. Panicul parțial fertil: A – linia MHI și totalmente fertil: B – inductor F₆.

În general, putem spune că utilizarea liniilor cu caractere cantitative ameliorate, ce produc polen în cantități considerabile și sunt rezistente la cădere sporesc considerabil procesul obținerii haploizilor materni, iar polenizarea manuală poate fi ușor înlocuită cu cea naturală-deschisă.

3.1.5. Liniile LHI (*Linie Haploid Inductoare*) 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 *BI* și *PII*); parametrilor morfologici cu valori înalte; rezistenței la cădere; fertilității paniculului; ratei haploizilor de minimum 9 %, în a. 2011 din populațiile descendente F₆ s-a reușit selectarea a 11 linii numite LHI (*Linie Haploid Inductoare*) (Figura 3.17).

În a.2012 s-a inițiat un proiect de colaborare cu Institutul de Fitotehnie „Porumbeni” pe durată de 5 ani (aa.2012 – 2017) care prevede utilizarea materialului genetic de porumb, creat în această instituție în scopul eficientizării procesului de ameliorare prin utilizarea haploidiei, ce accelerează crearea liniilor homozigote de porumb. Aceasta a constituit un bun prilej și de testare a noilor linii LHI, în special a capacității de inducere a haploizilor și sistemului de gene marker pe fondalul unui spectru larg de hibrizi.

Conform unor date din literatură, germoplasma maternă influențează frecvența dezvoltării boabelor haploide [96, 145] și manifestării fenotipice a genelor marker [86]. În cercetările noastre, oportunitatea de a obține boabe cu embrion haploid dintr-un spectru larg de genotipuri a favorizat.



Fig. 3.17. Linii cu capacitate de inducere a haploizilor materni la porumb.

1 – ZMS, 2 – Stock 6, 3 – MHI, 4 – LHI 10, 5 – LHI 9

analiza detaliată a influenței donozilor asupra ratei de obținere a haploizilor și manifestării markerilor antocianici.

Frecvența haploizilor pe știulete în diferiți donori a variat de la 1,5 la 18,2%. Comparativ cu genitorul MHI, cu randamentul mediu de inducere de până la 8 %, linia LHI 7 pe fondalul a 14 donori a prezentat o rată medie de circa 9,9%. Liniile LHI fiind implicate în încrucișări cu diferiți donori au manifestat un randament înalt de inducere, maximele variind în limitele 11,3-

18,2% (Tabelul 3.16). Liniile LHI 1, LHI 4, LHI 11 au demonstrat eficiență redusă din care motiv nu au fost indicate în tabel [10].

Atenție deosebită s-a acordat analizei sistemului marker al liniilor LHI în procesul identificării haploizilor pe fondalul diferiților donori. 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.

Tabelul 3.16. Eficiența de inducere a haploizilor a liniilor LHI în dependență de combinația donator \times inductor (a.2012)

Inductor	Număr de donori	Număr de boabe	Eficiența medie de inducere a haploizilor, %	Variația ratei haploizilor în funcție de donator,%
LHI 2	12	2978	8,5 ± 0,46	2,5 – 14,2
LHI 3	11	1761	8,3 ± 0,64	2,1 – 15,0
LHI 5	6	611	9,8 ± 0,64	3,6 – 15,9
LHI 6	8	659	7,2 ± 0,59	1,5 – 14,3
LHI 7	14	1935	9,9 ± 0,76	3,7 – 18,2
LHI 8	12	1326	6,7 ± 0,48	2,1 – 11,8
LHI 9	12	1676	5,1 ± 0,51	1,9 – 11,3
LHI 10	14	2926	6,7 ± 0,51	2,5 – 12,1

O etapă importantă în aprecierea sistemului marker al liniilor LHI a constituit evaluarea intensității pigmentării antocianice în boabele uscate obținute, ca rezultat al încrucișării acestora cu donorii (Tabelul 3.17).

S-a constatat, că intensitatea pigmentării antocianice a endospermului și embrionului, evaluată în scara de 5 trepte, a variat la genotipurile cercetate între 0,9 și 3,9 în embrion și de la 0 la 3,7 în endosperm.

Din totalul de genotipuri, doar la hibridul 12 sinteza antocianului în endosperm și embrion s-a dovedit a fi destul de slabă (gradul 1,0), din care motiv haploizii practic nu au putut fi selectați. La hibridul 20, dimpotrivă intensitatea pigmentării a prezentat valori de 3,9 în embrion și 3,4 în endosperm, iar diferența între boabele haploide și hibride fiind evidentă a făcut posibilă selectarea haploizilor cu exactitate înaltă [10].

Tabelul 3.17. Influența genotipului matern asupra pigmentării antocianice a endospermului și embrionului boabelor uscate, controlată de gena *RI-nj*

Genotip	Număr de boabe	Intensitatea pigmentării, grad	
		Embrion	Endosperm
Hibrid 1	177	3,5 ± 0,4	2,5 ± 0,4
Hibrid 2	501	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,3
Hibrid 3	587	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Hibrid 4	725	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Hibrid 5	1317	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Hibrid 6	579	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,0
Hibrid 7	1305	3,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2
Hibrid 8	492	3,1 ± 0,2	2,5 ± 0,1
Hibrid 9	687	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Hibrid 10	848	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Hibrid 12	236	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Hibrid 13	841	3,5 ± 0,1	2,5 ± 0,2
Hibrid 14	987	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Hibrid 15	1096	3,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Hibrid 16	535	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2
Hibrid 17	225	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Hibrid 18	948	3,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2
Hibrid 19	649	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Hibrid 20	735	3,9 ± 0,1	3,4 ± 0,2
Hibrid 21	644	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1
Hibrid 23	1005	3,7 ± 0,2	3,6 ± 0,2
Hibrid 27	243	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Hibrid 28	264	2,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Hibrid 29	153	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3
Hibrid 30	273	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1

Prin analiză corelațională, s-a constatat că între gradul de pigmentare a endospermului și embrionului există o dependență 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 nehaploide/diploide (Figura 3.18).

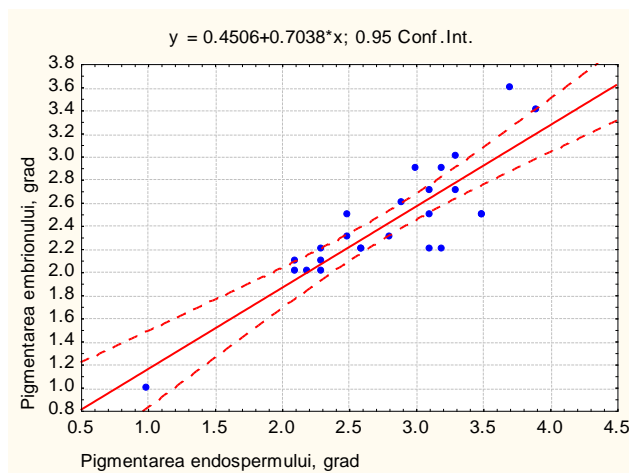


Fig. 3.18. Analiza regresională a dependenței colorației endospermului de colorația embrionului.

Sistemul marker al liniilor LHI mai conține genele *BI* și *PII* ce controlează sinteza antocianului în sistemul radicular la plantule de 3-4 zile. Ca rezultat al germinării boabelor s-a constatat că germoplasma maternă nu influențează expresia *BI* și *PII*, demonstrând o colorație intensă violetă a sistemului radicular în plantulele hibride ale tuturor donatorilor utilizați în testare (Figura 3.19).



Fig. 3.19. Pigmentația antocianică în sistemul radicular la plantule hibride de 3-4 zile, determinată de genele *BI* și *PII* (1 ... 29 – numărul genotipului)

Plantulele haploide se dezvoltă din ovule nefecundate și nu conțin genele marker, din care motiv au un sistem radicular nepigmentat, spre deosebire de hibrizi cu rădăcini pigmentate. Astfel, diferența între haploizi și diploizi este evidentă, iar selectarea se face cu exactitate înaltă.

O altă etapă în aprecierea eficienței sistemului marker al liniilor LHI a constituit identificarea haploizilor pe fondalul diferiților donori la faza de boabe uscate, după care exactitatea selectării s-a determinat suplimentar la etapa de plantule de 3-4 zile.

Pentru aceasta s-a luat câte un știulete din diferiți donori polenizați cu inductor, inițial efectuându-se identificarea haploizilor conform markerului *RI-nj*, după care numărul total de boabe s-a pus la germinație, iar plantulele haploide s-au identificat prin manifestarea fenotipică a genelor *BI* și *PII* (Tabelul 3.18).

Tabelul 3.18. Eficiența selectării haploizilor din diferite genotipuri maternelor la faza de boabe uscate (*RI-nj*) și plantule de 3-4 zile (*BI* și *PII*)

Genotip	Numărul de boabe	Gradul de pigmentare		Nr. haploizilor conform expresiei genelor:	
		Embrion	Endosperm	<i>RI-nj</i>	<i>BI</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 *BI* și *PII* în plantule și expresiei genei *RI-nj* în boabe uscate gradul de corelație (r) este 0,65*, ecuația de regresie fiind: $y = 4,1448 + 0,655 * x$, în care y – gradul de expresie a genelor *BI* și *PII*, iar x – gradul de expresie a genei *RI-nj*.

Astfel, s-a constatat că la donorii cu manifestare puternică a genei *R1-nj* în endosperm și embrion, numărul de haploizi coincide cu cel estimat la faza de plantule, ca exemplu servind Hibrizii 2, 3, 6, 7 și dimpotrivă, cu cât pigmențația din aleuronă și scutelum este mai slabă, haploizii la faza de boabe uscate sunt selectați inexact – Hibrizii 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19 (Figura 3.20).

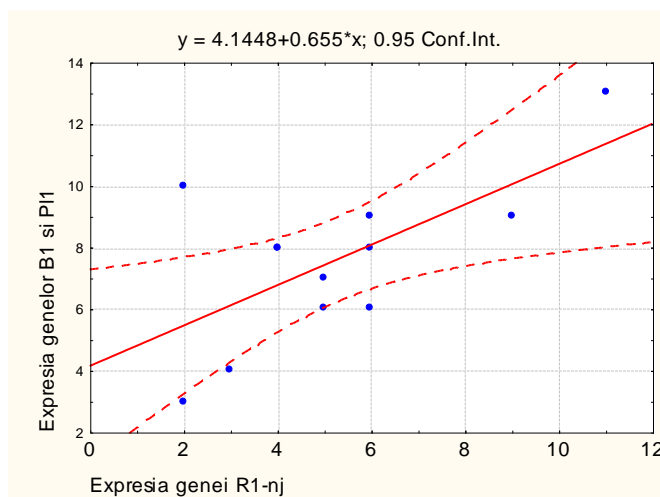


Fig. 3.20. Analiza regresională a dependenței expresiei genelor marker *B1* și *P11* în plantule de expresia genei *R1-nj* în cariopsele de porumb.

În asemenea situații, soluția constă în testarea suplimentară la faza de plantule, care de altfel sporește veridicitatea selectării haploizilor autentici. Astfel, dacă *R1-nj* manifestă pigmențație intensă, haploizii se selectează doar la faza de boabe uscate. În cazul pigmențației antocianice slabe în endosperm și embrion, identificarea se va face suplimentar prin germinarea cariopselor și cultivarea plantulelor până la etapa de 3-4 zile.

În anul următor – 2013 s-a continuat obținerea haploizilor dintr-un alt material, de asemenea pus la dispoziție de Institutul de Fitotehnie „Porumbeni” care a inclus genotipuri din covarietățile *Zea mays dentiformis* și *Z. mays indurata*. În scopul vizat, s-a propus și testarea inductorilor LHI 2, LHI 3 și LHI 7 de generația a 7. La determinarea ratei de obținere a haploizilor, s-au luat în considerație știuleții polenizați în intervalul 2-3 zile de la apariția mătăsutului, cu un bun randament de boabe. Astfel, frecvența haploizilor pe știuleții polenizați cu inductorii LHI 2, LHI 3 și LHI 7 a variat de la 1,41 la 21,1%, rata medie a acestora înregistrând valori de 9,0-15,8%. Rezultatele obținute cu privire la influența germoplasmei materne asupra inducerii haploizilor au demonstrat că la obținerea acestora din covarietatea *Z.m. indurata*, rata este mai redusă decât din *Z. mays dentiformis* [96]. Date similare s-au atestat și în cercetările prezentate. Astfel, inductorul LHI 2 în încrucișările cu donorii din prima covarietate de porumb a

indus haploizi cu o rată medie de 9,0-11,1%, iar cu a doua – 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 covarietăți de porumb (Tabelul 3.19).

Tabelul 3.19. 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>Covarietatea Z. 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>Covarietatea 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

Rezultatele obținute au demonstrat, că rata haploizilor induși de fiecare inductor în covarietatea *Z. mays indurata* este aproximativ de două ori mai mică, decât în covarietatea *Z. mays dentiformis*.

Pe lângă faptul, că germoplasma maternă influențează capacitatea de inducere a haploizilor, conform datelor din literatură, acest efect depinde și de perioada când s-a realizat polenizarea [207].

Este cunoscut faptul că cea mai înaltă rată de haploizi se obține în cazul polenizării știuleților la 2-3 zile după apariția mătasei. Pornind de la aceasta, s-a propus estimarea randamentului de obținere a haploizilor la știuleții polenizați după mai multe zile de la apariția mătasei, aceștia fiind polenizați cu inductorul LHI 7 (Tabelul 3.20).

Rezultatele prezentate în tabelul 3.20 demonstrează 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 la apariția mătasei. În cazul polenizării știuleților la 4 zile postanteză în genotipurile 1, 2, 3 și 15, rata haploizilor s-a redus aproximativ de 2 ori.

După 6 zile, 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.

Tabelul 3.20. Rata haploizilor (%) la diferiți donori în dependență de perioada de polenizare (inductor – LHI 7)

Donor	Ziua polenizării după apariția mătasei			Media ratei haploizilor, %
	2 zile	4 zile	6 zile	
1	14,0	8,8	4,35	9,1±2,8
2	15,4	8,3	3,34	9,0±3,5
3	10,5	9,7	5,04	8,4±1,7
11	17,1	17,7	14,71	16,5±0,9
15	15,2	8,7	4,81	9,6±3,0
Media	14,5±1,1	10,6±1,8*	6,5±2,1*	

*- $p \leq 0,05$ în raport cu ziua 2.

Datele demonstrează că la acest donator, gametofitul feminin își păstrează viabilitatea pe o durată mai mare de timp, din care motiv știuleții pot fi polenizați și mai târziu, pierderile de haploizi fiind neimportante. Din atare motiv s-a concluzionat că genotipul 11 prezintă avantaje în raport cu ceilalți donori și poate fi utilizat cu succes la testarea performanței liniilor inductoare și obținerea haploizilor [11].

Este cunoscut faptul, că inflorescența maternă la porumb se dezvoltă treptat, iar numărul de haploizi obținuți depinde de maturitatea acesteia. Haploizi sunt în majoritatea cazurilor repartizați la vârful știuletelui [85]. În tabelul 3.21 sunt prezentate rezultatele aprecierii ratei semințelor haploide formate la vârful și baza știuletelui.

Tabelul 3.21. Frecvența de formare a haploizilor (%) la vârful și baza știuletelui în dependență de perioada de polenizare după apariția mătasei (inductor LHI 7)

Donor	2 zile		4 zile		6 zile	
	Vârf	Bază	Vârf	Bază	Vârf	Bază
1	9,5	4,3	6,6	2,2	3,1	1,4
2	11,1	3,9	5,8	2,4	1,1	0,9
3	6,1	4,4	6,2	3,6	3,6	2,8
11	10,4	6,7	12,1	5,4	10,4	6,4
15	8,4	6,8	5,7	3,0	3,5	1,3
r:	0,04		0,88*		0,97*	

*- $p \leq 0,05$.

Cercetările noastre au demonstrat că, într-adevăr, rata boabelor haploide este mult mai înaltă la vârful știuletelui, însă în evoluția dezvoltării și maturizării inflorescenței feminine, indicele descrește la ambele variante – „vârf” și „bază”. 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, a rămas 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 3.21).

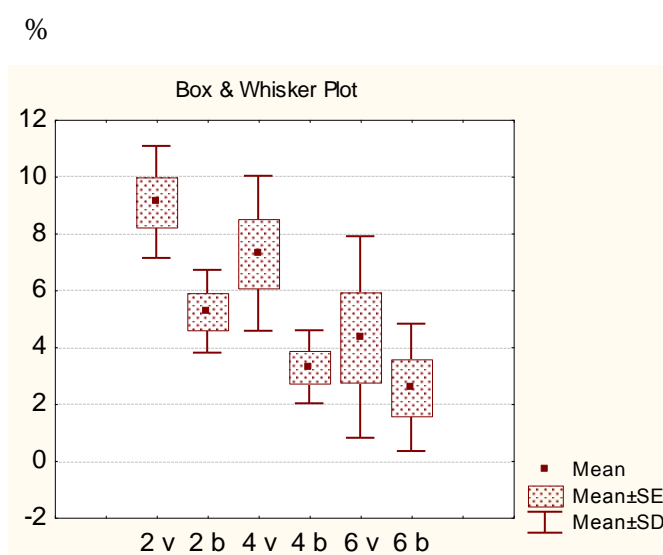


Fig. 3.21. Rata de formare (%) a boabelor haploide la vârful și baza știuletelui, funcție de ziua polenizării: 2, 4, 6.

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 (Figura 3.21).

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, din care motiv aparatul reproductiv feminin la etape mai târzii are, practic aceeași totipotență la extremitățile știuletelui. Analiza factorială a capacității de inducere a haploizilor de către liniile LHI 2, 3 și 7, a demonstrat că în a.2013 varianța pură a caracterului a fost cea mai înaltă pentru factorul matern (5,935), urmată fiind de variabilitatea modificalională (2,357), cauzele căreia sunt diverse: diferența de vârstă a știuleților, zilele diferite de colectare a polenului, condițiile diferite de creștere a plantelor, adică – suma tuturor factorilor fiziologici și ecologici. Factorul de *linie inductoare* ușor a cedat variabilității modificalionale: 2,335. Rolul interacțiunilor *donor x inductor* a fost nesemnificativ, adică deosebiriile între inductori n-au depins de forma maternă (Tabelul. 3.22).

Tabelul 3.22. Analiza bifactorială a frecvenței de inducere a haploizilor, a.2013

Sursa de variație	Varianța observată	df	Varianța teoretică	df	Varianța pură	Testul F
Eșantionul	-	-	-	-	5,927	-
Variabilitatea modificalională	8,284	50	5,927	15000	2,357	1,40*
Linia inductoare – factorul A	2,690	2	0,355	50	2,335	7,58**
Forma maternă (donorul) – factorul B	6,527	4	0,592	50	5,935	11,03***
Interacțiunea factorilor $A \times B$	3,723	8	2,367	50	1,356	1,57

*- $p \leq 0,05$; **- $p \leq 0,01$; ***- $p \leq 0,001$.

În următorul an de studiu – 2014, s-a constatat practic același tablou, însă rolul factorului matern a fost puțin mai pronunțat, varianța pură a acestuia constituind 15,692 (***- $p \leq 0,001$).

Se poate concluziona că capacitatea de inducere a haploizilor în anumită măsură depinde de forma maternă (donor). Deosebirile între inductori nu sunt prea mari și sunt comparabile după mărime cu variabilitatea modificățională. Adică liniile LHI au practic același potențial de inducere a haploizilor. Interacțiunile *donor x inductor* sunt ne semnificative, adică deosebirile între inductori se reproduc constant pe fondalul diferiților donori (Tabelul 3.23).

Tabelul 3.23. Analiza bifactorială a frecvenței de inducere a haploizilor, a.2014

Sursa de variație	Varianța observată	df	Varianța teoretică	df	Varianța pură	Testul F
Eșantionul	-	-	-	-	3,870	-
Variabilitatea modificățională	6,810	39	3,870	9000	2,940	1,76**
Linia inductoare – factorul A	2,193	2	0,401	39	1,792	5,47**
Forma maternă (donorul) – factorul B	16,266	3	0,534	39	15,692	30,46***
Interacțiunea factorilor <i>A x B</i>	0,673	6	1,602	39	-	0,42

- $p \leq 0,01$; *- $p \leq 0,001$.

În procesul obținerii haploizilor din diferite genotipuri de porumb s-a constatat, că liniile LHI în dependență de combinație induce formarea haploizilor cu o frecvență mai mare de 9%. Sistemul marker al genelor – *R1-nj*, *B1* și *PII*, eficiența căruia depinde într-o oarecare măsură de sursa donatoare permite ușor și exact selectarea haploizilor la diferite faze de dezvoltare. Datele obținute demonstrează, că ameliorarea caracterelor calitative și cantitative conduce la rezultate scontante, iar inductorii LHI permit obținerea unui randament înalt de plante haploide din diferite genotipuri de interes genetic și ameliorativ.

3.2. Mecanisme ale fenomenului de inducere a haploizilor materni

Deși inducerea haploizilor *in vivo* prin intermediul inductorilor este intensiv explorată la producerea hibridilor de porumb în cantități industriale, mecanismul biologic al fenomenului

nu este pe deplin înțeles [96, 111, 194, 195, 202, 227]. Există două ipoteze plauzibile al acestuia: 1) unul din spermii inductorului este defectuos, dar încă capabil să fecundeze ovulul; ulterior, în timpul dividerii celulelor cromozomii paterni degenerază și treptat sunt eliminați din celulele primordiale; al doilea, fecundează celula centrală dezvoltând endospermul normal triploid [140, 243, 249]; 2) unul din spermii inductorului nu este apt de a fuziona cu ovulul, dar poate genera embriogeneza haploidă; al doilea fuzionează cu celula centrală conform primei ipoteze [66, 98, 226]. Potrivit ambelor supoziții, perturbările din microspori distorsionează fecundarea dublă după polenizarea cu inductorii [205].

3.2.1. Fenomenul de heterofertilizare în procesul inducerii haploizilor

După cum se știe, în timpul fertilizării duble normale, unul din spermii fertilizează ovulul dând naștere embrionului, în timp ce al doilea fuzionează cu nucleul central formând endospermul triploid [153]. Heterofertilizarea în timpul fecundării duble, semnifică participarea spermilor din diferite grăuncioare de polen. Ca rezultat, boabele combină endosperm și embrion, diferiți din punct de vedere genetic.

În literatura de specialitate se atestă date ce confirmă, că la liniile cu capacitate de inducere s-a depistat o frecvență înaltă de heterofertilizare, fenomenul posibil fiind indus de perturbările meiotice din microspori care influențează rata haploizilor [205, 110]. Inițial se considera, că diminuarea ratei genotipurilor haploide este provocată de polenizările întârziate [77], ulterior s-a admis, că o posibilă cauză a diminuării prezintă fenomenul de heterofertilizare [205]. La inductori, diferențele morfologice și funcționale între spermii implică fecundarea ovulului și nucleului central cu spermii ai diferiților microspori. S-a propus analiza frecvenței de heterofertilizare la inducerea haploizilor în condiții de polenizare artificială prin utilizarea genelor marker ce reglează sinteza antocianului în endosperm și embrion. În încrucișările cu polenizatorul heterozigot ce posedă asemenea gene cu donatorul homozigot recesiv, heterofertilizarea se manifestă prin apariția boabelor cu endosperm pigmentat și embrion nepigmentat, sau invers [153], în calitate de marker servind gena *RI-nj* [118, 183].

În fiecare sezon, la obținerea haploizilor s-a depistat, că polenizarea liberă a știuleților donorului cu inductorii, comparativ cu cea artificială (manuală) reduce frecvența haploizilor. Pornind de la cele menționate, două linii - A464 și A619 în calitate de forme maternelle s-au încrucișat cu un inductor și cu o linie obișnuită – X28C (fără capacitate de inducere), ambii polenizatori fiind deținători ai genei *RI-nj*. Ca rezultat al diferitelor tipuri de polenizări:

polenizare simplă cu polen patern; polenizare cu amestec de polen (patern/matern) 1:1; autopolenizări repetate după 24, 48, 72 ore s-au obținut patru variante de boabe:

- 1) boabe maternelne fără pigmentare antocianică,
- 2) boabe cu pigmentare antocianică a endospermului și embrionului,
- 3) boabe cu pigmentație antocianică a endospermului,
- 4) boabe cu pigmentație antocianică a embrionului (Figura 3.22).

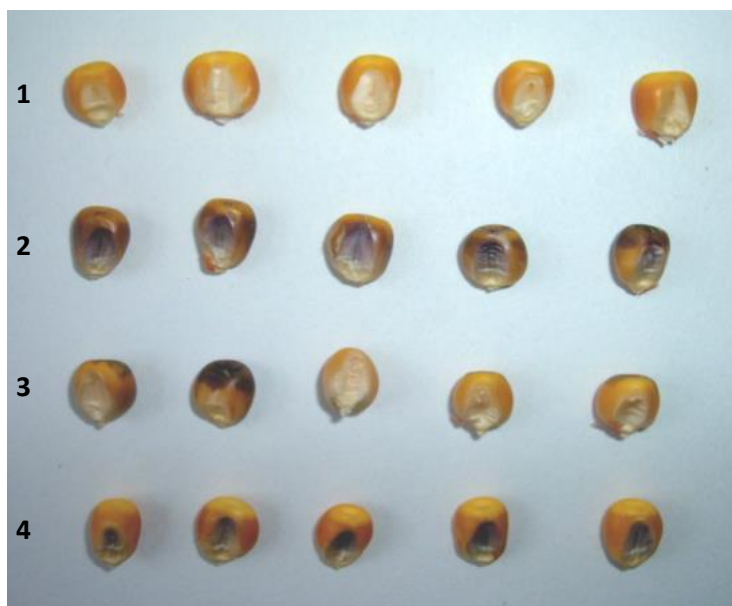


Fig. 3.22. Diferențierea boabelor conform manifestării fenotipice a genei *RI-nj*.

Astfel, în baza pigmentării doar a endospermului sau a embrionului, ușor putem deduce că boabele din varianta 3 și 4 au rezultat din heterofertilizare. Printre boabele din aceste variante s-au detectat și haploizi, confirmați ulterior la creșterea plantelor [209].

Fenomenul de heterofertilizare a fost mai evident la combinațiile în care ca polenizator s-a utilizat inductorul (Tabelul 3.24).

În polenizările cu amestec de polen 1:1 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.

Tabelul 3.24. 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	-	-

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 (Figura 3.24).



Fig. 3.24. Știuleți materni proveniți din polenizări repetate.

În condiții de polenizare liberă pe suprafețe izolate, frecvența de heterofertilizare la fel poate fi înaltă, când spermii penetrați anterior (purători de inducere a haploizilor) sunt înlocuiți cu spermii normali. În asemenea cazuri, procentul de haploizi se reduce semnificativ comparativ cu polenizarea manuală (artificială) [204].

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 [207]. Cel mai probabil aceasta se datorează numărului 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 perfectă între numărul de haploizi și un randament înalt al boabelor pe știulete.

Unii autori consideră că heterofertilizarea este o abatere de la fecundarea dublă obișnuită. Totuși, aceste abateri pot oferi anumite informații despre procesul fertilizării și factorii ce influențează dezvoltarea endospermului și embrionului [143].

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

Ca rezultat al polenizării donorului cu polenul inductorilor se obțin diferite variante de boabe:

- boabe hibride – rezultat al fecundării duble a nucleului central și ovulului;
- boabe haploide – rezultat al fecundării doar a nucleului central, pe când embrionul se dezvoltă din ovulul haploid nefecundat;
- boabe fără endosperm – rezultat al fecundării ovulului, în timp ce nucleul central rămâne nefertilizat;
- boabe fără embrion – rezultat al fecundării celulei centrale dezvoltând endospermul triploid, fără fecundarea ovulului.

De asemenea, se pot dezvolta boabe cu endosperm redus și embrion viabil (Figura 3.25). Unele dintre aceste boabe demonstrează capacitate de germinare normală (Figura 3.26).

Chalyk și colab. (2003) au menționat, că dereglările în dezvoltarea celulelor spermatice pot fi rezultatul acțiunii unui sau mai multor factori genetici. Dereglările din grăuncioarele de polen duc la dezvoltarea celulelor spermatice diferite, distorsionând fecundarea dublă, ceea ce conduce la dezvoltarea embrionului din ovul nefecundat, cât și apariția boabelor fără embrion și endosperm [66]. 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. Autopolenizarea inductorului cu capacitate de inducere de 10% a determinat formarea a 10,2% boabe fără embrion, iar la polenizarea liniei A464 s-au obținut 0,4%.



Fig. 3.25. Boabe cu endosperm redus și embrion viabil.



Fig. 3.26. Germinarea boabelor cu endosperm redus și embrion viabil (rândul de sus), boabe normale (rândul de jos).

Procentul boabelor fără endosperm la autopolenizarea inductorilor poate atinge valori de până la 30%. La fel, poate fi înaltă și frecvența boabelor cu endosperm redus, sau fără endosperm și cu embrion viabil [209]. La următoarea etapă a cercetărilor noastre s-a constatat, că la inductori doar gametofitul masculin perturbază fecundarea dublă normală. La polenizarea inductorului cu o linie obișnuită A464 s-au obținut boabe diploide normale cu un bun randament pe știulete. Acesta demonstrează, că inflorescențele feminine (știuleții) nu posedă careva anomalii, din care motiv nu apar diferite variante de boabe (Figura 3.27).

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 și incert.

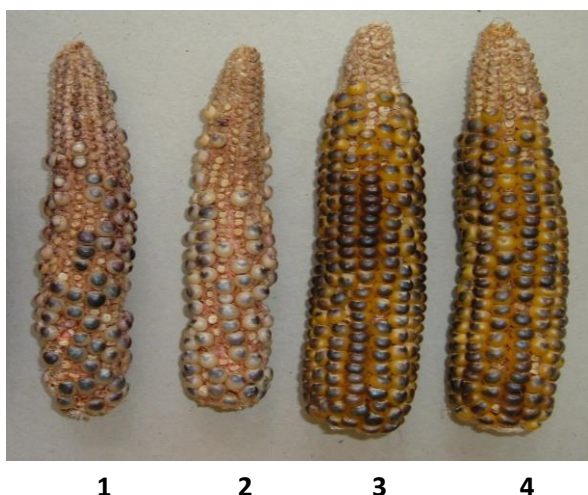


Fig. 3.27. Randamentul boabelor pe știulete (1, 2 – inductor autopolenizat; 3, 4 – inductor polenizat cu linia A 464).

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

În prezent plantele haploide oferă largi oportunități la crearea liniilor homozigote și prezintă o verigă importantă în tehnologia haploidiei care cuprinde 2 etape: (i) obținerea haploizilor, prin polenizarea sursei donor cu polen de la liniile inductoare și identificarea acestora, (ii) dublarea numărului de cromozomi la plantele haploide și autopolenizarea plantelor dublu haploide pentru multiplicarea materialului.

Necesitatea de dublare a numărului de cromozomi la haploizi este determinată de restabilirea fertilității, generarea plantelor dublu haploide la autopolenizarea cărora se obțin linii pure/homozigote. În natură, dublarea cromozomilor la haploizi poate avea loc spontan. Frecvența restabilirii fertilității feminine este destul de înaltă și evidentă prin randamentul boabelor pe știulete ce variază în limitele 25-96%, în timp ce rata fertilității masculine este mult mai redusă ~ 3% [69, 111]. Pentru plantele haploide, restabilirea fertilității masculine în mod spontan reprezintă un caracter extrem de valoros ce depinde în mare măsură de genotip, din care cauză pentru utilizarea cu succes a liniilor DH în diferite scopuri se recurge la dublarea cromozomilor pe cale artificială.

O eficiență sporită în procesul de dublare a cromozomilor demonstrează colchicina [121,235]. Deși este un agent toxic, aplicarea acestuia la obținerea liniilor DH nu poate fi înlocuită cu un careva alt inhibitor mitotic, care să demonstreze o eficacitate mai înaltă [90, 237]. În procesul dat, colchicina inhibă formarea microtubulilor și fusului de diviziune, din care motiv celula mamă păstrează setul dublu de cromozomi [240].

Până în prezent obținerea liniilor DH în număr suficient de mare, rămâne un factor limită pentru tehnologia haploidiei, deoarece metodele de dublare a numărului de cromozomi elaborate spre regret, nu demonstrează eficiență înaltă. Plus la aceasta, metodele utilizate necesită condiții, cheltuieli financiare, echipament special și sunt destul de dificil de realizat.

Una din cele mai utilizate metode de dublare a numărului de cromozomi, propusă de Deimling constă în germinarea boabelor până când coleoptilul atinge lungimea de 4 cm. Partea superioară este înlăturată, iar plantulele sunt introduse în soluție de colchicină de 0,06% și DMSO de 0,5% timp de 12 ore, după care sunt transferate în condiții de câmp. Această metodă permite restabilirea fertilității masculine la ~ 40% plante tratate, dintre care 10-20% produc boabe [96]. Pentru metoda dată, transferarea plantulelor prezintă un factor de risc, deoarece de rând cu necesitatea de adaptare la condițiile de câmp, acestea fiind tratate cu substanță toxică sunt ușor deprimare.

În general, eficiența metodei de dublare a numărului de cromozomi la haploizi se determină în baza numărului de plante tratate, ce formează panicul fertil, iar la autopolenizare formează boabe.

În cele mai frecvente cazuri, administrarea colchicinei nu în toate celulele induce dublarea uniformă a numărului de cromozomi și restabilirea totală a fertilității masculine, efectul fiind vizibil la nivel de panicul. Unele plante tratate rămân sterile (A), altele formează câteva antere fertile (B), sau panicul complet fertil (C) (Figura 3.28).

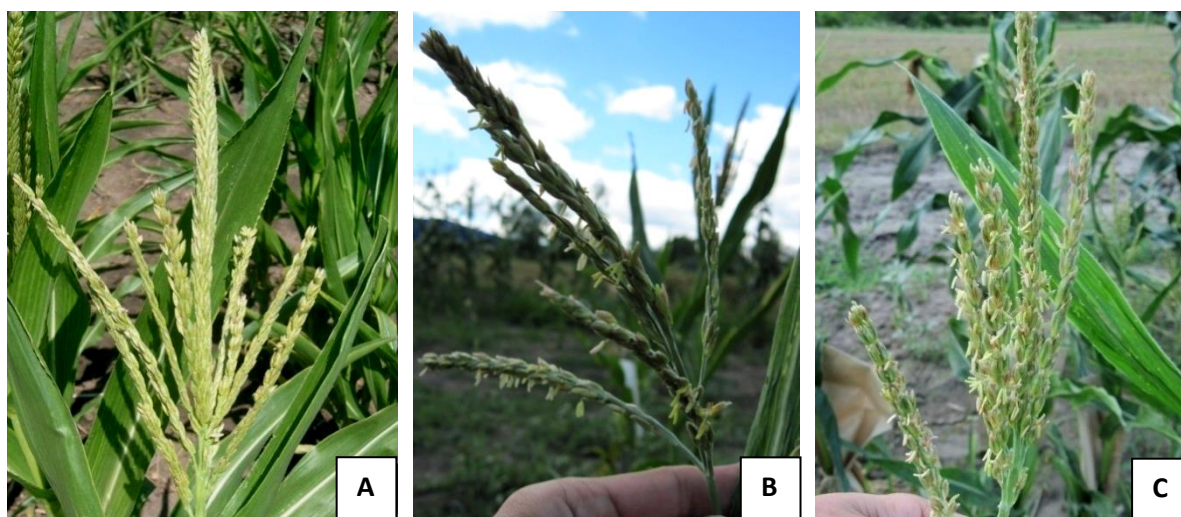


Fig. 3.28. Diferite tipuri de panicul la plantele tratate cu colchicină.
(A – steril, B – parțial fertil, C – complet fertil).

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 cromozomilor la haploizi prin procedeul „găurire” Procedeul prevede găurirea zonei de creștere și înfășurarea acesteia cu material îmbibat în soluție de colchicină de diferită concentrație – 0,06 și 0,12% (Tabelul 3.25). 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 nu a contribuit la restabilirea fertilității masculine la nici una din plantele tratate (Tabelul 3.25).

Tabelul 3.25. Eficiența de dublare a numărului de cromozomi la plantule haploide în condiții de câmp prin procedeul „găurire”(a.2009)

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×Ky123)	0,12	12	3	36,1	22,2
			4	41,6	19,4
n(Ky123) – martor	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	10,1	8,5

Utilizarea colchicinei în concentrația de 0,12% 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 este 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×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 [3, 8].

La testarea procedurii „găurire” în a. 2010 s-a utilizat colchicină de 0,12%, iar administrarea s-a efectuat la faza de 3 frunze, cu perioadă de tratare de 12 ore. Tratarea haploizilor n(MK109) cu soluție de colchicină de 0,12% a permis restabilirea fertilității masculine la 36,23% de plante, dintre care 16,0% au format boabe. Administrarea reactivului de dublare la haploizii n(Rf7×Ky123) a avut o eficiență de 24,13% și 11,6%, respectiv, pentru rata plantelor fertile și celor ce au format boabe în rezultatul autopolenizării (Tabelul 3.26).

Tabelul 3.26. Eficiența de dublare a cromozomilor la plantule haploide în condiții de câmp prin procedul „găurire” (a.2010)

Genotip	Concentrație, %	Expoziție, ore	Număr de frunze	Plante, %	
				Fertile	Cu boabe
n(MK109)	0,12	12	3	36,2	16,0
n(Rf7×Ky123)				24,1	11,6
n(Ky123) – martor	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	20,6	6,9

Rezultatele testării pe durata a 2 vegetații au demonstrat faptul, că tratarea haploizilor prin procedul „găurire” necesită concentrații mai înalte ale reactivului, care de altfel a prezentat o eficiență de dublare de 2 ori mai mare, decât în varianta martor.

Dublarea numărului de cromozomi la haploizi prin procedul „tăvitură” Procedul prevede trecerea aței prin zona de creștere și introducerea capetelor acesteia în eprubeta cu soluție de colchicină. În testare s-au utilizat soluții de 0,06 și 0,12%. 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 al 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.

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 cromozomilor la haploizii n(Rf7×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 3.27).

Tabelul 3.27. Eficiența de dublare a numărului de cromozomi la plantule haploide în condiții de câmp prin procedeul „tivitură” (a. 2009)

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×Ky123)	0,12	12	3	9,7	3,2
			4	17,4	4,3
n(Ky123) - martor	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	10,1	8,5

În a.2010 la testarea procedeului „tivitură” s-a utilizat soluții de colchicină de 0,03 și 0,06% (Tabelul 3.28).

Tabelul 3.28. Eficiența de dublare a cromozomilor la plantule haploide în condiții de câmp prin procedeul „tivitură” (a.2010)

Genotip	Concentrație, %	Expoziție, ore	Număr de frunze	Plante, %	
				Fertile	Cu boabe
n(MK109)	0,06	12	3	13,1	8,1
	0,03			4,9	1,3
n(Rf7×Ky123)	0,06	12	3	20,4	7,5
	0,03			11,5	5,4
n(Ky123) - martor	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	20,6	6,9

Tratarea haploizilor n(Rf7×Ky123) la faza de 3 frunze cu colchicină de 0,06% a prezentat o frecvență de 20,4% de plante cu panicul fertil și rată de 7,5% de plante cu boabe. În cazul haploizilor n(MK109) eficiența de dublare a cromozomilor la haploizi a constituit 13,1 și 8,1%, respectiv [3]. Folosirea colchicinei de 0,03% la restabilirea fertilității masculine a manifestat o eficiență și mai redusă, comparativ cu cea de 0,06%. La tratarea haploizilor n(Rf7×Ky123) s-au obținut 11,5% plante fertile și 5,4% plante cu boabe. În cazul administrării reagentului la haploizii n(MK109) 4,9% de plante au dezvoltat panicul fertil, iar 1,3% de plante în rezultatul autopolenizării au format boabe. Dublarea numărului de cromozomi la plantule haploide prin procedeul „tivitură” în sezonul următor a demonstrat o frecvență înaltă de plante sterile de până la 80%. Se poate presupune că concentrațiile joase, în special cea de 0,03% au fost ineficiente la inhibarea dividenței mitotice și ca rezultat mult mai puține plante au format panicul fertil.

Dublarea cromozomilor la haploizi prin procedeul „absorbție” Procedeul prevede înfășurarea zonei de creștere cu material îmbibat în soluție de colchicină, fără careva leziuni mecanice. În testare a fost utilizat genotipul n(Rf7×Ky123), soluția de colchicină de 0,12% la o expoziție de 12 ore (Tabelul 3.29).

Comparativ cu procedeul „găurire” și „tivitură”, înfășurarea zonei de creștere a demonstrat rezultate nesemnificative în raport cu varianta martor. Astfel, tratarea haploizilor n(Ky123) cu colchicină de 0,12% la faza de 3 frunze a permis obținerea a 9,7% plante fertile și

3,2% cu boabe. La faza de 4 frunze s-au obținut valori de 13,1 și 4,3%, respectiv caracterelor cercetate.

Tabelul 3.29. Eficiența de dublare a numărului de cromozomi la plantule haploide prin procedeul „absorbție”

Genotip	Concentrație, %	Expoziție, ore	Număr de frunze	Plante, %	
				Fertile	Cu boabe
n(Rf7×Ky123)	0,12	12	3	9,7	3,2
			4	13,1	4,3
n(Ky123) – martor	0,06	12	Plantule de 3-4 zile	10,1	8,5

Din numărul total de plante tratate, aproximativ 90% plante au rămas sterile. Rata joasă de plante cu panicul fertil care au format boabe face plauzibilă supoziția, că reagentul în cazul zonei intacte de creștere este inefficient pentru inhibarea dividerii mitotice a celulelor.

Conform celor menționate, metoda propusă de Deimling a servit ca martor – metodă de referință pentru testarea procedeelelor de dublare a numărului de cromozomi la haploizi în condiții de câmp. În cele două sezoane de testare, această metodă a demonstrat o eficiență de 6-9% de plante dublu haploide ce au format boabe. De asemenea, rezultatele obținute au evidențiat faptul, că o mare parte din plantele tratate rămân totuși sterile ~ 80-90%. O posibilă cauză a menținerii sterilității masculine, poate fi transferarea materialului din condiții de laborator în câmp, fapt ce afectează vigoarea plantei, cu atât mai mult, că acestea sunt tratate cu substanță toxică.

În cazul dublării numărului de cromozomi la plantele haploide, direct în condiții de câmp, administrarea colchicinei se efectuează la o etapă de dezvoltare mai târzie. Posibil, că acest lucru afectează mult mai puțin vigoarea plantei și ca rezultat crește probabilitatea restabilirii fertilității masculine. Tratarea haploizilor cu colchicină în condiții de câmp și de laborator în două sezoane consecutive a demonstrat, că eficiența metodei de dublare a cromozomilor, în mare măsură, depinde și de condițiile de mediu [8]. Din materialul obținut, ca rezultat al autopolenizării plantelor dublu haploide din combinația Rf7 × Ky123 se obțin deja linii homozigote (Figura 3.29). La unele din aceste linii s-a determinat unii din parametrii morfologici, iar în calitate de martor au servit liniile tradiționale Rf7 și Ky123 (Tabelul 3.30).

Tabelul 3.30. Parametrii cantitativi la liniile homozigote RK din combinația Rf7 x Ky123 create prin metoda dublării numărului de cromozomi la haploizi în condiții de câmp

Linia	Înălțimea plantei, cm	Lungimea știuletelui, cm	Diametrul știuletelui, cm	Nr. rândurilor de semințe
Rf7 - martor	200,9	16,5	4,26	20,7
Ky123 - martor	186,3	13,9	3,93	12,5
RK-21	202,9	13,6	4,75	18,8
RK-22	202,8	10,3	4,87	17,0
RK-23	193,2	11,6	4,60	20,0
RK-29	181,2	13,3	3,97	12,5
RK-30	200,6	14,0	4,74	17,5
RK-31	215,8	14,4	4,01	15,6
RK-32	199,0	14,4	4,00	15,9
Eroarea medie	2,48	0,40	0,11	0,76

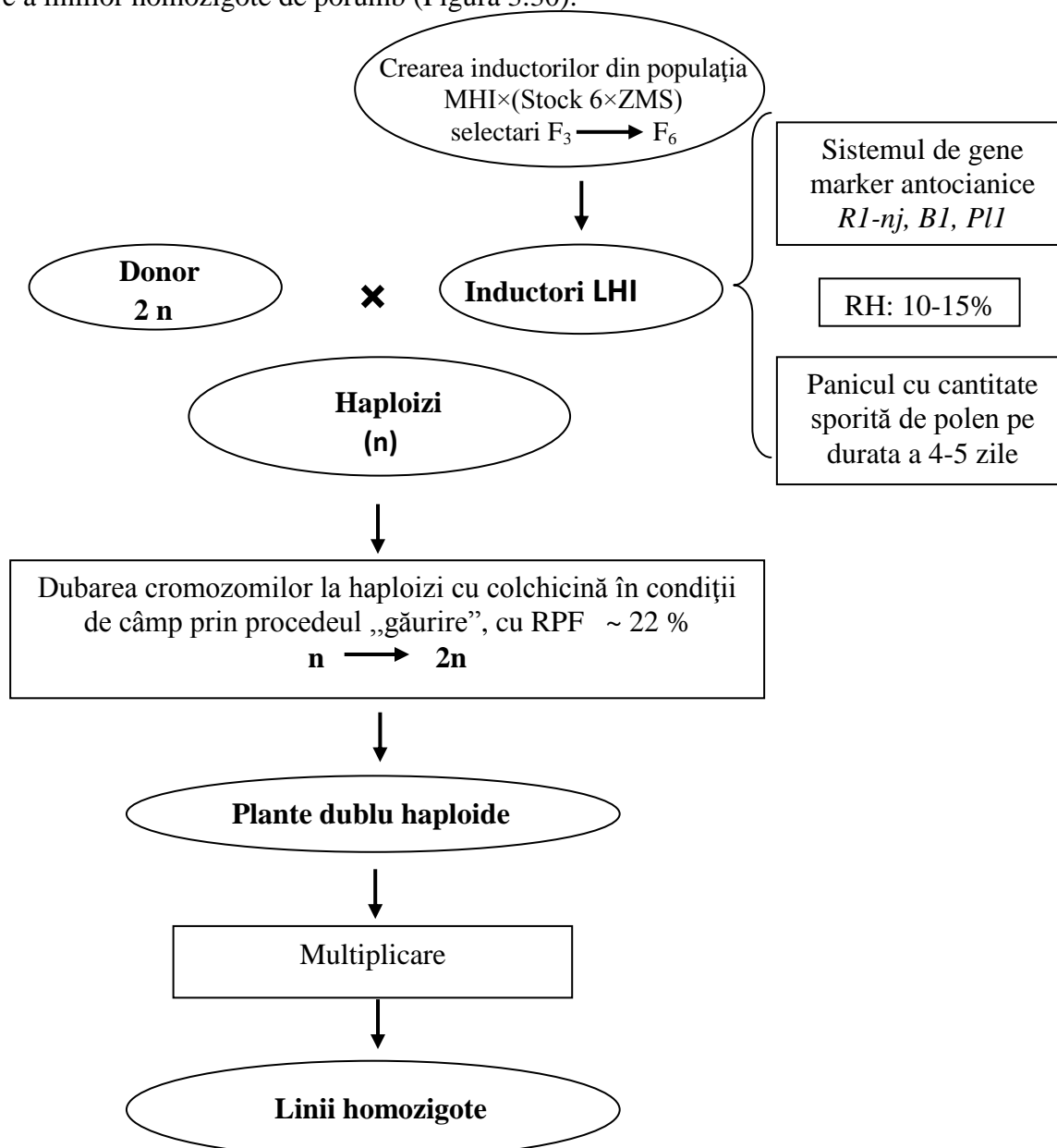
Potrivit rezultatelor obținute s-a constatat, ca liniile homozigote RK obținute prin tehnologia dubării haploizilor după parametri cantitativi nu se deosebesc de liniile obținute tradițional. Liniile RK au demonstrat valori ai parametrilor cantitativi în intervalul celor determinate la liniile inițiale Rf7 și Ky123.



Figura 3.29. Linii DH create prin metoda dublării cromozomilor la haploizii n(Rf7×Ky123) în condiții de câmp.

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 de autori 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. Cu toate acestea, sunt oportune cercetări suplimentare în vederea precizării tuturor factorilor de care depinde eficiența de dublare a numărului de cromozomi.

Astfel ca rezultat al cercetărilor, a fost elaborat conceptul de eficientizare a tehnologiei de creare a liniilor homozigote de porumb (Figura 3.30):



RH – rata haploizilor (%); RPF – rata plantelor fertile ce au produs boabe (%)

Fig. 3.30. Schema tehnologiei DH de creare a liniilor homozigote de porumb.

Deci, tehnologia 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.

Actualmente, majoritatea companiilor mari producătoare de porumb, activează în baza unor programe bine stabilite de producere a liniilor pure prin tehnologia haploidiei, din diferite surse de interes genetic și ameliorativ. Din acest motiv, o mare parte din cercetările în domeniul haploidiei până la moment rămân a fi concentrate asupra sporirii eficienței metodelor de dublare a cromozomilor la plantele haploide de porumb.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Liniile inductoare de haploizi materni la porumb cunoscute – Stock 6, ZMS, MHI s-au dovedit a fi un material inițial valoros pentru crearea noilor inductori. Prin încrucișarea acestora, selectarea în populațiile segregante F_2-F_4 și autopolenizarea plantelor care corespund anumitor criterii – rată înaltă de inducere a haploizilor; expresie pronunțată a genelor marker ale pigmentării antocianice; indici înalți ai înălțimii plantei, lungimii panicului, cantității de polen, duratei înfloririi panicului, s-a reușit obținerea familiilor performante de inductori F_6 , cele mai valoroase fiind F_{626} , F_{630} , F_{632} , F_{633} , F_{636} , F_{663} care au demonstrat pe fondalul genotipurilor donatoare – populației $SPC_4 \times SAC_3$ și hibridului Debiut un randament de haploizi de 10,5 ... 12,8% – mult mai înalt comparativ cu cel stabilit la martorul MHI (6,1%).

2. Analiza descendenților F_3 și F_4 , proveniți din încrucișările liniilor inductoare cunoscute 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. Repartizarea asimetrică a formelor F_4 selectate din combinația perspectivă – MHI x

(ZMS x Stock 6) denotă existența unei variații genetice, disponibilă procesului de selecție care cu fiecare autopolenizare poate avansa.

3. Prin încrucișarea liniilor inductoare de haploidie Stock 6, ZMS, MHI s-a reușit combinarea într-un singur sistem genetic ai markerilor ce determină sinteza antocianului (*RI-nj*, *BI*, *PII*), fapt care a contribuit la eficientizarea și sporirea preciziei de identificare a boabelor/plantulelor haploide. 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*. Pe lângă aceasta, comparativ cu ZMS, care se deosebește de ceilalți genitori - Stock 6 și MHI prin pigmentare pronunțată a antocianului în endosperm și embrion, markerul *RI-nj* al formelor F_6 create determină o sinteză mult mai înaltă a pigmentului.

4. Analiza clusteriană (dendrograme de repartiții) a liniilor inductoare F_6 , în baza unor caractere importante – înălțimea plantei, lungimea paniculului, cantitatea de polen, durata înfloririi paniculului, a demonstrat că liniile F_6 36, F_6 37, F_6 63, F_6 38, F_6 39, care au prezentat valori înalte ale indicilor incluși în studiu au prezentat o similitudine mai înaltă cu linia MHI, decât cu ZMS sau Stock 6. 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*.

5. Din familiile F_6 cu capacitate înaltă de inducere a haploizilor, expresie pronunțată a genelor marker și indici cantitativi ameliorați au fost selectate în final 3 linii LHI (*Linie Haploid Inductoare*) care fiind testate pe fondalul mai multor donori au demonstrat o capacitate de inducere a haploizilor de 10,0...15,8%, efectul depinzând atât de polenizator cât și de sursa donor ceea ce relevă rolul important al interacțiunilor *donor x inductor* la dezvoltarea acestora. Astfel, rata haploizilor induși pe fondalul donozilor *dentiformis* este de aproximativ 2 ori mai înaltă decât pe fondalul *indurata*.

6. Analiza corelațională a demonstrat că între numărul haploizilor identificați în baza expresiei genelor *BI* și *PII* în plantule și expresiei genei *RI-nj* în boabe uscate gradul de corelație (r) este 0,65* ($p \leq 0,05$). La donozii cu manifestare puternică a genei *RI-nj* în endosperm și embrion, numărul de haploizi coincide cu cel estimat la faza de plantule și dimpotrivă, cu cât pigmentația din aleuronă și scutelum este mai slabă, haploizii la faza de boabe uscate sunt

selecții inexact, în acest caz fiind necesară o testare suplimentară la etapa de plantule în baza genelor *BI* și *PII* pentru a evita posibilele pierderi de boabe haploide.

7. Frecvența de formare a boabelor haploide este mai mare la vârful știuletelui decât la bază. În condiții optime de polenizare - 2 zile de la apariția mătasei nu există corelații între numărul boabelor formate la vârful și baza știuletelui, ceea ce conduce la ideea că aceste caractere sunt controlate de sisteme genice independente.

8. În baza analizei fenomenului de heterofertilizare și capacității polenului inductorilor de a dezvolta diferite variante de boabe s-a enunțat supoziția că mecanismul de inducere a haplozilor materni la porumb constă în fecundarea de către un singur spermă a celulei centrale din sacul embrionar al sursei donor, ovulul matern rămânând nefecundat.

9. La crearea liniilor dublu haploide de porumb este eficient procedeul de găurire a zonei de creștere a plantulelor de 3-4 frunze și administrarea soluției de colchicină în concentrație de 0,12% timp de 12 ore. De asemenea s-a constatat că procedeul optimizat, de dublare a cromozomilor la haploizi cu colchicină în condiții de câmp afectează mai puțin viabilitatea plantulelor, decât metoda pe larg utilizată la moment (Deimling).

10. Analiza unor indici biometrici de bază – înălțimea plantei, lungimea știuletelui, 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 selecții 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.

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 acesteia (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 ipoteza ipoteza 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. Botnari V., Andronic L., Cotenco E. Biotehnologii avansate – realizări și perspective, al III-lea Simpozion național cu participare internațională. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2013, nr. 3(321), p. 187-188.
2. Micu V. Ameliorarea plantelor necesită ameliorare. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele Vieții, 2015, nr. 2(326), p. 111-118.
3. Rotarenco 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.
4. 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.
5. Palii 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.
6. Partas E., Mihalachi A. Analiza genetică a unor surse cu limbul frunzei striat transversal din colecția de mutanți 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.
7. **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.
8. **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.
9. **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.
10. **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.
11. **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.
12. Гусева А., Качанова В. Сравнительная характеристика корней гаплоидов и диплоидов кукурузы. В: Апомиксис и цитозембриология растений. Вып. 2. Саратовский ун-т., 1971, с. 60-66.
 13. Еналеева Н., Откало О., Тырнов В. Фенотипическая экспрессия мутации в мегагаметофите кукурузной линии. В: Генетика, 1998, № 34, с. 259-265.
 14. Забирова Э. Получение, изучение и использование автодиплоидных линий кукурузы. В: Кукуруза и сорго, 2001, № 4, с. 18-20.
 15. Забирова Э., Чумак М., Шацкая О., Щербак В. Технология массового ускоренного получения гомозиготных линий. В: Кукуруза и сорго, 1996, № 4, с. 17-19.
 16. Забирова Э., Шацкая О. Эффективность метода гаплоидии при создании элитных линий кукурузы. В: Генетика селекция и технология возделывания кукурузы, Краснодар, 1999. с. 219-226.
 17. Завалишина А. Индуцированная гаплоидия у кукурузы. В: Труды международного симпозиума "Апомиксис у растений", Саратов, 1994. 64 с.
 18. Компьютерная биометрика. М: Изд-во Моск. ун-та, 1990, 232 с.
 19. Саратова Т.Н. Использование культуры пыльников для получения гаплоидов у кукурузы. В: Кукуруза и сорго, 2001, № 4, 21-23.
 20. Стрельчук С. Основы экспериментального мутагенеза. Киев: Высшая школа, 1981, 215 с.
 21. Тырнов В. Генетическое исследование гаплоидии у кукурузы (*Zea mays* L.). Автореферат канд. дисс. Саратов, 1970. 20 с.
 22. Тырнов В., Завалишина А. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов у кукурузы. В: Доклады Академии Наук СССР, 1984, Т. 276, с. 735-738.
 23. Тырнов В. Гаплоидия у растений: теория и практика. В: Тезисы науч. конференции «Развитие научного наследия акад. Н.И. Вавилова», Саратов, 1997, с. 31-33.
 24. Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. 221 с.
 25. Чалык Т.С. Создание стерильных аналогов линий кукурузы методом андрогенеза. В: Селекция растений с использованием цитоплазматической мужской стерильностью. Киев: Урожай, 1966, с. 38-50.

26. Чалык С., Чеботарь О. Использование матроклиных гаплоидных растений для изучения генетического контроля высоты растений у кукурузы. В: Генетика, 1999, № 35, с. 1244-1251.
27. Чалык С. Создание линий кукурузы, индуцирующих матроклиные гаплоиды. В: Цитология и генетика, 2000, № 5, с. 37-41.
28. Чалык С., Ротаренко В. Использование матроклиных гаплоидных растений в рекуррентном отборе у кукурузы. В: Генетика, 2001, № 37, с. 1642-1649.
29. Чалык С. Методы гаплоидии в генетике и селекции у кукурузы. Кишинёв: Изд. Центр ГАУМ, 2003, 179с.
30. Чумак М. Получение и выделение гаплоидов кукурузы. В: Кукуруза и сорго, 2001, N 4, с. 7-13.
31. Шатская О. Результаты использования метода гаплоидии в селекции кукурузы. В: Кукуруза и сорго, 2001, № 4, с. 14-17.
32. Шатская О. Щербак В. Использование модифицированной *ig*-системы для создания новых форм кукурузы с повышенным андрогенезом. В: Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы, Краснодар, 1999, с. 211-218.
33. Щербак В. Развитие работ по практическому использованию явления гаплоидии у кукурузы для ускорения селекционного процесса. В: Кукуруза и сорго, 2001, № 4, с. 4-6.
34. Юдин Б., Хватова М. Вопросы применения гаплоидии и полиплоидии в селекции кукурузы. В: Генетика, 1966, № 2, с. 60-67.
35. Alexander D. The genetic induction of autotetraploidy: A proposal for its use in corn breeding. In: J. Agron., 1957, p. 40-43.
36. Amar S., Becker H., Mollers C. Genetic variation and *genotype x environment* interactions of phytosterol content in three doubled haploid populations of winter rapeseed. In: Crop Science, 2008, vol. 48, p. 1000-1006.
37. Amzallag J. Critical period as fundamental events in life. In: Theory in Bioscience, 2004, vol. 123, p. 17-32.
38. Andersen S. Haploids in the improvement of woody species. In: Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry: Springer, 2005, vol. 56, p. 243-257.
39. Andersen J. et al. Development and mapping of gene-tagged SNP markers in locuses of maize (*Zea mays* L.). In: Plant Breeding, 2009, vol. 128, p. 423-425.
40. Antoine-Michard S., Beckert M. Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. In: Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 1997, 48, p. 203-207.

41. Baezinger P. et al. Agronomic performance of wheat doubled-haploid lines from cultivars by anther culture. In: *Plant Breeding*, 1989, vol. 103, p. 101-109.
42. Barnabas B., Pfahler P., Kovacs G. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, vol. 81, p. 675-678.
43. Barnabás B., Obert B., Kovács G. Colchicine an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anther. In: *Plant Cell Reproduction*, 1999, vol. 18, p. 858-862.
44. Barnabás B. Anther culture of maize (*Zea mays* L.). In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 2003, p. 103–108.
45. Barnabás B. et al. Az *in vitro* haploidindukciós képesség bevitele elit kukoricavonalakba keresztezéssel. Kukorica hibridek adaptációs képességének és termésbiztonságának javítása. (Transfer of *in vitro* anther culturability to elite maize lines by crossing. Improvement of adaptability and yield stability of maize hybrids.) In: *Kukoricakonzorcium (Maize Consortium)*. 2003, p. 4-9.
46. Barnabas B. et al. Strategy for improvement of doubled haploid production in maize. In: *Acta Agronomica Hungarica*, 2005, vol. 53 (2), p. 177-182.
47. Barret P., Brinkmann M., Beckert M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, vol. 117, p. 581-594.
48. Beckert M. Advantages and disadvantages of use of *in vitro* in maize produced DH maize plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1994, vol. 23, p. 201-213.
49. Belicuas P. et al. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. In: *Euphytica*, 2007, vol. 156, p. 95-102.
50. Belling J., Blakeslee A. The assortment of chromosomes in tetraploid *Daturas stramonium*. In: *American Nature*, 1924, vol. 58, p. 60-70.
51. Birchler J.A. Production of ploidy series. In: *The Maize Handbook*/Freeling, M. and Walbot, V., ed. Springer-Verlag. New York, 1994, p. 394-395.
52. Birchler J., Veitia R. The gene balance hypothesis: from classical genetics to modern genomics. In: *Plant Cell*, 2007, vol. 19, p. 395-402.
53. Birchler J., Yao H., Chudalayandi S. Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. In: *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, 1769(5-6), p. 422-428.

54. Blakeslee A., Beling B., Farnham M., Bergner A. A haploid mutant in the jimson weed, *Datura stramonium*. In: Science, 1922, vol. 55, p. 646-647.
55. Bohanec B. Ploidy determination using cytometry. In: Doubled haploid production in crop plants. Springer, 2003, p. 397-403.
56. Bouvier L. et al. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assesment using isozyme and microsatellite markers. In: Euphytica, 2002, vol. 123, p. 255-262.
57. Brown J., Caligari P. An Introduction to Plant Breeding. Oxford, Blackwell, 2008, 224 p.
58. Buter B. Einflussfaktoren der in vitro haploid induction bei *Zea mays* L. Ph. D. Thesis. Zurich, Switzerland, 1997.
59. Bylich V., Chalyk S. Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line. In: Maize Genetic Cooperation Newsletter, 1996, vol. 5, p. 135-163.
60. Carlini-Garcia L. et al. 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).
61. Caperta A. et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. In: Protoplasma, 2006, vol. 227, p. 147-153.
62. Chain E., Veilleux R., Boluarte-Medina T. Improvement androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. In: Plant Cell Tissue Organ Culture, 2000, vol. 60, p. 101-112.
63. Chalyk S. Use of maternal haploid improving maize inbred lines. In: Maize Genetic Cooperation News Letter, 1999, vol. 73, p. 73-77.
64. Chalyk S., Chebotar O. Utilizing maternal haploids to identity major genes controlling plant height in maize. In: Czech J. Genet. Plant Breeding, 1999, vol. 35, p. 73-77.
65. Chalyk S., Rotarenko V. Using maternal haploid plants in reccurent selection in maize. In: Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1999, vol. 33, p. 56-57.
66. Chalyk S. et al. Aneuploidy as a possibile cause of haploid induction in maize. In: Maize Genetic Cooperation News Letter, 2003, vol. 77, p. 29-30.
67. Chang M. Stock 6 induced doubled haploidy is random. In: Maize Genetics Cooperation News Letter, 1992, vol. 66, p. 98.
68. Chang M. Preferential fertilization induced from Stock 6. In: Maize Genetics Cooperation News Letter, 1992a, vol. 66, p. 99.

69. Chang M., Coe E. Doubled Haploids. In: Biotechnology in agriculture and forestry. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement, 2009, vol. 63. p. 127-142.
70. Chase S. Techniques for installing monoploid maize. In: Am. J. Bot., 1947, vol. 34, 582 p.
71. Chase S. The productive success of monoploid maize. In: Am. J. Bot., 1949, vol. 36, p. 795-796.
72. Chase S. Efficient methods of developing and improving inbred lines. The monoploid method of developing inbred lines. In: Report of 6th Hybrid Corn Industry Research Conference, 1951, p. 29-34.
73. Chase S. Monoploids in maize. In: Heterosis. Edited by J.W. Gowen Ames, Iowa, The Iowa State College Press, 1952, p. 389-399.
74. Chase S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. In: J. Agron., 1952(b), vol. 44, p. 263-267.
75. Chase S. Analytic breeding of *Solanum tuberosum* L. In: J. Canadian Genetic Cytology, 1963, vol. 5, p. 359-363.
76. Chase S. Parthenogenesis. In: Maize Genetic Cooperation Newsletter, 1964, vol. 38, p. 46.
77. Chase S. Monoploids and monoploid derivatives of maize (*Zea mays* L.). In: The Botanical Review, 1969, vol. 35, p. 117-167.
78. Chen S., Li L., Li H. Maize doubled haploid breeding [in Chinese]. In: China Agricultural University Press, Beijing, 2009.
79. Chen Z. et al. Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*. In: Plant Breeding, 1994, vol. 113, p. 217-221.
80. Cheng Y. et al. Unconditional and conditional quantitative trait loci mapping for plant height in non heading Chinese cabbage. In: Hort. Science, 2009, vol. 44, p. 268-273.
81. Chu C. et al. Whole genome mapping in wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits. In: Molecular Breeding, 2008, vol. 22, p. 251-266.
82. Chumak M. Use of *ig* mutation for CMS counterparts of corn lines. In: Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1980, vol. 54, p. 126.
83. Chumak M. The use of haploidy in maize breeding. In: Proc. Xth EUCARPIA meeting of maize and sorghum, Varna, 1983, p. 145-151.
84. Clausen R., Lammerts W. In: Interspecific hybridization in *Nicotiana*. X. Haploid and diploid merogony. In: Amer. Nat., 1929, vol. 43, p. 279-282.

85. Coe E. A line of maize with high haploid frequency. In: Amer. Nat., 1959, vol. 93, p. 381-382.
86. Coe E., Sarkar K. The detection of haploids in maize. In: J. Heredity, 1964, vol. 55, p. 231-233.
87. Coe E. The properties, origin and mechanism of conversion-type inheritance at the *bl* locus in maize. In: Genetics, 1966, vol. 53, p. 1035-1063.
88. Coe E. Anthocyanin genetics. In: The Maize Handbook, 1994, p. 279-281.
89. Cone K. Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. In: Plant Cell Monogr, 2007, vol.8, p. 121–139.
90. Dang N. et al. Inducer line generated double haploid seeds for combined *waxy* and *opaque 2* grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). In: Euphytica, 2010, vol. 183, p. 153-160.
91. Deimling S., Rober F., Geiger H. Methodik und genetik der *in vivo* Haploideninduktion bei Mais. In: Vortr Pflanzenzuchtg, 1997, vol. 38, p. 203-224.
92. Diao W. et al. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. In: Science Horticulture, 2009, vol. 119, p. 246-259.
93. Dietzman E., Foroughi-Wehn B. Combination of resistance to barley yellow mosaic virus and *Rhynchos porium secalis* by recurrent selection with repeated haploid steps. In: Plant Breeding, 1996, vol. 115, p. 179-182.
94. Dogimont C. et al. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annum* L.). In: Euphytica, 1996, vol. 88, p. 231-239.
95. Dunwell J. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. In: Plant Biotechnology, 2010, p. 327-424.
96. Eder J., Chalyk S. *In vivo* haploid induction in maize. In: Theoretical and Applied Genetics, 2002, vol. 104(4), p. 703-708.
97. Eimert K., Reutter G., Strolka B. Fast and reliable detection of doubled-haploids in *Asparagus officinalis* by stringent RAPD-PCR. In: J. Agricultural Science, 2003, vol. 141, p. 73-78.
98. Enaleeva N., Selivanova L., Zavalishina A. Mechanism of matroclinal haploidy induction in maize by male parent PEMS-2. In: XI International Symposium. Embryology and Seed Reproduction, 1992, p. 145-146.
99. Enelaeva N., Otkalo O., Tyrnov V. Cytological expression of (*ig*) mutation in megagametophyte. In: Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1995, vol. 69, p. 124.

100. Evans D. Somaclonal Variation. In: Tomato Biotechnology, 1987, vol. 4, p. 59-69.
101. Fisher F. Molekulargenetische Untersuchungen zum Vorkommen palernaler DNA – Übertragung bei der in-vivo- haploideninduktion bei Mais (*Zea mays* L.). Ph. D Thesis, Stuttgart, Germany, 2004.
102. Ford L. Some cytogenetic aspects of maize monoploids and monoploid-derivatives. Ph. D. Thesis, Iowa, 1952, 118 p.
103. Forougi-Wehr B., Wenzel G. Recurrent selection alternating with haploid steps – a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeding. In: Theoretical and Applied Genetics, 1990, vol. 80, p. 564-568.
104. Forster B. et al. The resurgence of haploids in higher plants. In: Trends Plant Science, 2007, vol. 12, p. 368-375.
105. Forster B., Thomas W. Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: Plant Breeding Review, 2005, vol. 25, p. 57-88.
106. Gaines E., Aase H. A haploid wheat plant. In: American Journal of Botany, 1926, vol. 13, p. 373-385.
107. Gallais A. A method of line development using doubled haploids: the single doubled haploid descent recurrent selection. In: Theoretical and Applied Genetics, 1988, vol. 75, p. 330-332.
108. Gayen P. et al. Chromosome doubling in haploids through colchicines. In: Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1994, vol. 68 p. 65.
109. Geiger H., Roux S., Deimling S. Herbicide resistance as a marker in screening for maternal haploids. In: Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1994, vol. 68, p. 99.
110. Geiger H.H. Doubled haploids. In: Maize Handbook. Vol. II: Genetics and Genomics. Springer Verlag, Heidelberg, New York, 2009, p. 641-659.
111. Geiger H., Gordillo G. Doubled haploids in hybrid maize breeding. In: Maydica, 2009, vol. 54, p. 485-499.
112. Genovesi A. Maize (*Zea mays* L.): *in vitro* production of haploids. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1990, vol.12, p. 176-203.
113. Georgiev S. Haploids in Genetics and Cytogenetical Research. In: Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2008, vol.22, issue 2, p. 644- 651.
114. Goodsell S.F. Male sterility in corn by androgenesis. In: Crop Science, 1961, vol.1 (3), p. 227-228.
115. Gordilo G., Geiger H. Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding. In: Crop Science, 2008, vol. 48, p. 911-922.

- 116.Govindaraj P. et al. Analysing genetic control of cooked grain traits and gelatinization temperature in a double haploid population of rice by quantitative trait loci mapping. In: *Euphytica*, 2009, vol. 166, p. 165-176.
- 117.Grafe C. Isoenzyme zur Characterisierung von haploiden Regeneratpflanzen und der Einsatz von Phosphataseinhibitoren zur Verbesserung der Regeneration *in vitro* bei Äpfel (*Malus domestica* Borkh). Ph. D Thesis, Hannover, 2003, p. 197.
- 118.Greenblatt I., Bock M. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. In: *J. Heredity*, 1967, vol. 58, p. 9-13.
- 119.Guzy-Wrobelska J., Szarejko I. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. In: *Plant Breeding*, 2003, vol. 122, p. 305-313.
- 120.Hallauer A., Carena M., Miranda F. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Springer, New York, 2010, 663 p.
- 121.Hantzschel K., Weber G. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. In: *Protoplasma*, 2010, vol. 241, p. 91-104.
- 122.Hantzschel K. Bestimmung und Optimierung von colchicin-alternativen für die doppelhaploiden-technik bei mais (*Zea mays* L.). Ph. D Thesis, Hohenheim, Germany, 2011, 110 p.
- 123.Han X. et al. Study on identifying methods of maize haploids induced by Stock 6. In: *J. Maize Science*, 2006, vol. 14(1), p. 64-66.
- 124.Heckenberger M., Bohn M., Melchinger A. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds. In: *Crop Science*, 2005, vol. 45, p. 1120-1131.
- 125.Henry Y. Origin of microspore-derived dihaploid and polyhaploid *in vitro* plants. In: *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1998, vol. 4, p. 127-135.
- 126.Hesse C. Monoploid peaches, *Prunus persica* L. Batsch: description and meiotic analysis. In: *J. American Society for Horticultural Science*, 1971, vol. 96, p. 326-330.
- 127.Ho K., Jones G. Mingo barley. In: *Canadian J. of Plant Science*, 1980, vol. 60, p. 279-280.
- 128.Hoestra S. et al. Microspore culture of *Hordeum vulgare* L: the influence of density and osmolality. In: *Plant Cell Reproduction*, 1993, vol. 12, p. 661-665.
- 129.Houbeng A., Pickering R. Applying cytogenetics and genomics to wide hybridization in the genus *Hordeum*. In: *Genetics and Genomics of the Triticeae*. *Plant Genetics and Genomics*, 2009, vol.7, Springer, p. 137-162.

- 130.Hu H. *In vitro* haploids production in wheat. In: *In vitro* haploids production in higher plants, Netherlands, Springer, 1996, vol. 4, p. 73-97.
- 131.Isakov Y., Butorina A., Muraya L. Discovery of spontaneous haploids in *Pinus sylvestris* and the prospects of their using in forest genetics and selection. In: *Genetika*, 1981, vol. 17, p. 701-707.
- 132.Jauhar P. et al. Inter- and intragenomic chromosome pairing in haploids of durum wheat. In: *J. Heredity*, 1999, vol. 90, p. 437- 445.
- 133.Jauhar P. et al. Seedset on synthetic haploids of durum wheat: cytological and molecular investigations. In: *Crop Science*, 2000, vol. 40, p. 1742-1749.
- 134.Jauhar P. Spontaneous haploids in durum wheat: their cytogenetic characterization. In: *Euphytica*, 2006, vol. 148, p. 341-344.
- 135.Jauhar P., Xu S., Baezinger P. Haploidy in cultivated wheats, induction and utility in basic and applies research. In: *Crop Science*, 2009, vol. 49, p. 737-755.
- 136.Johnson C., Wernsman E., La Mondia J. Effect of a chromosome segment marked by the *Ph p* gene for resistance to *Phytophthora nicotianae* on reproduction of tobacco cyst nematodes. In: *Plant Disease*, 2009, vol. 93, p. 309-315.
- 137.Kanenko Y. et al. Genetic stability and maintenance of *Raphanus sativus* lines with an added *Brassica rapa* chromosome. In: *Plant Breeding*, 2003, vol. 122, p. 239-243.
- 138.Karasawa K. The occurrence of haploid seedlings in *Citrus natsudaidai* In: *Bulletin of Sakushingakuin Junior College for women*, 1971, vol. 1, p. 1-2.
- 139.Kasha K. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: *Haploids in Crop Improvement II*, 2005, vol. 56, p. 123-152.
- 140.Kasha K., Kato K. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Nature*, 1970, vol. 225, p. 874-876.
- 141.Kasha L., Seguin-Shwartz G. Haploidy in crop improvement. In: *Cytogenetics of Crop Plants*, 1983, p. 19-68.
- 142.Katayama Y. Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. In: *Cytologia*, 1934, vol. 5, p. 235-237.
- 143.Kato A. Induced single fertilization in maize. In: *Sex Plant Reproduction J.*, 1997, vol. 10, p. 96-100.
- 144.Kato A. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. In: *Plant Breeding*, 2002, vol. 121, p. 370-377.

145. 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.
146. Kermicle J. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. In: Science, 1969, vol. 116, p. 1422-1424.
147. Kimber G., Riley R. Haploid angiosperms. In: Botanical Review, 1963, vol. 29, p. 480-531.
148. Kindiger B. Development of a tertiary trisomic (AA B-A) stock carrying *indeterminate gametophyte (ig)*. In: Maize Genetic Cooperation Newsletter, 1991, vol. 65, p. 64.
149. Kindiger B., Hamann S. Generation of haploids in maize: a modification of the indeterminate gametophyte (*ig*) system. In: Crop Science, 1993, vol. 33, p. 342-344.
150. Kindiger B. Registration of 10 genetic stocks of maize for the transfer of cytoplasmatic male sterility. In: Crop Science, 1994, vol. 34, p. 321-322.
151. Kitamura S., Akutsu M., Okazaki K. Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies. In: Sex Plant Reproduction, 2009, vol. 22, p. 9-14.
152. Klima M., Vyvadilova M., Kucera V. Chromosome doubling effects of selected antimutagenic agents in *Brassica napus* microspore culture. In: Czech J. Genetics Plant Breeding, 2008, vol. 44, p. 30-36.
153. Kraptchev B., Kruleva M., Dankov T. Induced heterofertilization in maize (*Zea mays* L.) In: Maydica, 2003, vol. 48, p. 271-273.
154. Ku M. et al. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays* L.). In: Proceeding of symposium on plant tissue culture. Peking: Science Press, 1978, p. 35-41.
155. Lapitan V. et al. Molecular characterization and agronomic performance of DH lines from the F₁ of *indica* and *japonica* cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). In: Field Crops Research, 2009, vol. 112, p. 222-228.
156. Lashermes P. Gynogenesis et androgenese *in vitro* chez le maïs (*Zea mays* L.): études génétique et physiologique, utilisation en sélection. These de l'université de Clermont II. France, 1987, 183 p.
157. Lashermes P., Gailard A., Beckert M. Gynogenetic haploid plants analysis for agronomic and enzymatic markers in maize (*Zea mays* L.). In: Theoretical and Applied Genetics, 1988, vol. 76, p. 570-572.
158. Lashermes P., Couturon E., Charrier A. Combining ability of doubled haploids in *Coffea canephora*. In: Plant Breeding, 2006, vol. 112, p. 330-337.

- 159.Laurie D., Bennett M. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat x maize crosses. In: Genome, 1989, vol. 32, p. 953-961.
- 160.Lefebvre V., Palloix A. Both, epistatic and additive effects of QTL are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction paper *Phytophthora capsici* Leonian. In: Theoretical and Applied Genetics, 1996, vol. 93, p. 505-511.
- 161.Li L. et al. Morphological and molecular evidences of DNA introgression in a haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. In: Planta, 2009, vol. 230, p. 367-376.
- 162.Lin B. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametoghyte (*ig*) mutation in maize. In: Rev. Brasileira de Biologia, 1981, vol. 41, p. 557-563.
- 163.Lin B. Ploidy barrier to endosperm development in maize. In: Genetics, 1984, vol. 107, p. 103-115.
- 164.Liu C., Douches D. Production of haploids of potato (*Solanum tuberosum*) and their identification with electrophoretic analysis. In: Euphytica, 1993, vol. 70, p. 113-126.
- 165.Liu Z., Song T. Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid. In: Acta Scientiarum: Agronomy, 2000, vol. 26(6), p. 947-952.
- 166.Lotfi M. et al. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. In: Plant Cell Reproduction, 2003, vol. 21, p. 1121-1128.
- 167.Lu C. et al. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled haploid population. In: Theoretical and Applied Genetics, 1997, vol. 94, p. 145-150.
- 168.Ma L. et al. Quantitative trait loci for panicle layer uniformity identified in doubled haploid lines of rice in two environments. In: J. Integrative Plant Biology, 2009, vol. 51, p. 818-824.
- 169.Mahuku G. et al. Progress in doubled haploid production at CIMMYT. Presentation held at the Drought Tolerant Maize for Africa (DTMA). Annual Project Meeting, Nairobi, Kenya, 13–18 September 2010.
- 170.Maluszynski M, Kasha KJ, Szarejko I. Published protocols for other crop plant species. In: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 309–336.
171. Marchand S. et al. Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. In: Plant Cell Reproduction, 2008, vol. 27, p. 443-451.

172. Martinez M. et al. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium apa* L.) using polyamines. In: Plant Science, 2000, vol. 156, p 221-226.
173. Mayerhofer R. et al. Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*. In: Genome, 1997, vol. 40, p. 294 -301.
174. Mazoti L., Muhlenberg C. Haploides naturale sen maiz. In: Revista Argentina de Agronomia, 1958, vol. 25, p. 171-178.
175. Melchinger A.E. et al. Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative genetic and selection theory for optimum allocation of resources. In: Proceedings of the forty first annual Illinois corn breeders' School 2005, Urbana-Champaign, USA, 2005, p. 8–21.
176. Melchinger A. et al. Rapid and accurate identification of *in vivo* induced haploid seeds based on oil content in maize. In: Scientific Reports, 3, nr 2129, 2013, DOI:10.1038/screp021292013.
177. Miao S.H. et al. Induction of Pollen Plants of Maize and Observations on Their Progeny. Proc. Symp. Plant tissue culture, Beijing 1978. Pitman, Boston, 1981, p. 23-34.
178. Miller O. Cytological studies in *asynaptic* maize. In: Genetics, 1963, vol.48, p. 1445-1466.
179. Murigneux A. et al. Molecular and morphological evaluation of doubled haploids lines in maize. I. Homogeneity within DH lines. In: Theoretical and Applied Genetics, 1993, vol. 86, p. 837-842.
180. Murigneux A., Baud S., Beckert M. Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. Comparison with single seed-descent lines. In: Theoretical and Applied Genetics, 1993a, vol. 87, p 278 -287.
181. Murovec J., Bohanec B. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Plant Breeding, 2012, p. 87-106.
182. Nadarajan N., Gunasekaran L.M. Quantitative genetics and biometrical techniques in plant breeding. Kalyani Publishers, New Delhi, Ludhiana, India. 2005, p. 221-242.
183. Nanda D., Chase S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). In: Crop Science, 1966, vol. 6, p. 213-215.
184. Nath U. et al. Inheritance and variation of erucic acid content in a transgenic rapeseed (*Brassica Napus* L.) doubled haploid population. In: Molecular Breeding, 2009, vol. 23, p. 125-138.
185. Nei M. The efficiency of haploid methods of plant breeding. In: Heredity, 1963, vol. 18, p. 95-100.
186. Niemirowics-Szczytt K. Biotechnology in haploids and polyploids. In: Biotechnologia, 1996, vol. 1, p. 52-59.

187. Palmer C., Keller W. Overview of haploidy. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 2005, vol. 56, p. 3-9.
188. Pauk J. Production of haploid plants of maize (*Zea mays* L.) through androgenesis. In: *Cereal Research Communication*, 1985, vol.13, p. 47-53.
189. Pedersen H., Keimer B. Haploidy in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: *In vitro* haploid production in higher plants, 1996, vol, 3, p. 17-36.
190. Peloquin S., Gobert A., Ortir R. Nature of pollinator effects in potato (*Solanum tuberosum* L.) in haploid production. In: *Annals of Botany*, 1996, vol. 77, p. 539-542.
191. Pink D. et al. Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas. In: *Euphytica*, 2008, vol. 164, p. 509-514.
192. Pintos B., Manzanera J., Bueno M. Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. In: *J. Plant Physiology*, 2007, vol. 164, p. 1595-1604.
193. Prasanna B. et al. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. In: *Molecular Breeding*, 2010, vol. 26, p. 339-356.
194. Prasanna B., Chaikam V., Mahuku G. Doubled haploid technology in maize breeding: Theory and Practice. CIMMYT, Mexico, 2012, 56 p.
195. 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.
196. Quyang J. et al. Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants. In: *Plant Science*, 1994, vol. 98, p. 209-214.
197. Randolph L. Some effects of high temperature on poliploidy and other variations in maize. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1932, vol. 18, p. 222-229.
198. Randolph L. Note on haploid frequencies. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 1938, vol. 14, p. 23-24.
199. Rhoades M., Dempsey E. Introduction of chromosome doubling at meiosis by the elongate gene in maize. In: *Genetics*. 1966, vol. 54, p. 505-522.
200. Ribadia K. et al. Genetic diversity in macaroni wheat (*Triticum durum* Desf.). In: *J. Maharastra Agricultural University*, 2007, vol. 32, p. 32-34.
201. Rines H. et al. Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations. In: *In vitro* haploid production in higher plants, 1997, p. 205-221.

202. 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.
203. Roman I. et al. Callus induction through anther culture in peach-tomato plants (*Solanum sesiliflorum* Dunal). In: *Asian J. Plant Science*, 2009, vol. 8, p. 199-205.
204. Rotarencu V. Production of matroclinal maize haploids following natural and artificial pollinations with a haploid inducer. In: *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2002, vol. 76, p.16.
205. Rotarencu V., Eder J. Possible effects of hetero-fertilization on the induction of maternal haploid in maize. In: *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2003, vol. 77, p. 30.
206. Rotarencu V., Chalyk S., Eder S. Utilization of maize haploid plants in a recurrent selection procedure. In: *J. Genetics and Breeding*, 2004, vol. 58, p. 61-72.
207. Rotarencu V., Mihailov M. The influence of ear age on the frequency of maternal haploids produced by haploid inducing line. In: *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 2007, vol. 81, p. 9-10.
208. Rotarencu V. et al. Haploid recurrent selection in improvement on synthetic population in maize. În: XXIth International Conference Eucarpia, 2009, p. 100.
209. Rotarencu V., Dicu G., **Sarmaniuc M.** Induction of maternal haploids in maize. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 2009, p. 15-17.
210. Saisingthong S. et al. Colchicines – mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.) In: *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, vol. 92, p. 1017-1023.
211. Sakamoto S. Cytogenetic studies in the tribe *Triticeae*. I. A polyhaploid plant of *Agropyron tsukushiense* var. *transiens ohwi* found in a state of nature. In: *Japanese J. Genetics*, 1964, vol. 39, p. 393-400.
212. **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.
213. **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, Chisinau, Republic of Moldova, Chișinău: ArtPoligraf, 2015, p. 140.

214. Sarkar K., Coe E. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. In: *Genetics*, 1966, vol. 54, p. 453-464.
215. Schmidt W. Hybrid maize breeding at KWS SAAT AG. In: Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Gumpenstein, 2003, p. 1-6.
216. Scanlon M., Takes E. Kernel Biology. In: *Handbook of Maize: Its Biology*, Springer, 2009, p. 121-143.
217. Schneerman M., Charbonneau M., Weber D. A survey of *ig* containing materials. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 2000, vol. 74, p. 92-93.
218. Seaney R. Monoploids in maize. In: *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, 1954, vol. 28, p. 22.
219. Seguí-Simarro J., Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. In: *Physiology Plant*, 2008, vol. 134, p. 1-12.
220. Seitz G. The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st annual Illinois Corn Breeder's School, Urbana-Champaign, 2005, p. 1-7.
221. Shatskaya J. et al. Mass induction of maternal haploids of corn. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 1994, vol. 28, p. 22.
222. Shatskaya J. et al. The use of the gene *ig* in sterile-counterpart production of corn lines. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 1997, vol. 71, p. 45.
223. Shi J. et al. Unraveling the complex trait of crop yield with QTL mapping in *Brassica napus*. In: *Genetics*, 2009, vol. 182, p. 851-861.
224. Simak M., Gustaffson A., Ching K. Occurrence of a mosaic aneuploid in polyembryonic Norway spruce seed. In: Technical Report. (Stockholm), 1968, nr 67, p. 1-8.
225. Stadler L. Frequency of haploids. In: *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, 1940, vol. 14, p. 27.
226. Swapna M., Sarkar K. Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.). In: *Maydica*, 2011, vol. 56, p. 221-225.
227. Tang Q. et al. Study on haploid inducing and its meiotic abnormality in maize. In: *Agricultural Sciences in China*, 2009, vol. 8, p. 1159-1165.
228. Testillano P. et al. Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. In: *Chromosoma*, 2004, vol. 112, p. 342-349.

229. Thomas W., Forster B., Gertsson B. Doubled haploids in breeding. In: Doubled Haploid Production in Crop Plants, 2003, p. 337-349.
230. Thompson K. Oil-seed rape. In: Reports of the Plant Breeding Institute, Cambridge, 1972, p. 94-96.
231. Toppino G. ISSR and isoenzyme characterization of androgenetic dihaploids reveals tetrasomic inheritance in tetraploid somatic hybrids between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* group Gilo. In: J. Heredity, 2008, vol. 99, p. 304-315.
232. Touraev A., Pfosser M., Heberle-Bors E. The microspore: A haploid multipurpose cell. In: Advances in Botanical Research, 2001, vol. 35, p. 53-109.
233. Touraev A., Forster B., Jain S. Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science, The Netherlands, 2009, 208 p.
234. Toyama T. Haploidy in peach. In: Hort. Science, 1974, vol. 9, p. 187-188.
235. Tseng Y. New methods for haploid selection in maize. Graduate Theses and Dissertations, Iowa, 2012, 105 p.
236. Uchino A. A spontaneous haploid plant of *Trillium smallii*. In: J. Journal Genetics, 1973, vol. 48, p. 65-67.
237. Vanous A. Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.). Graduate theses and dissertation, Iowa, 2011, 115 p.
238. Vanwynsberghe L. et al. Limited application of homozygous genotypes in apple breeding. In: Plant Breeding, 2005, vol. 124, p. 399-403.
239. Verdoodt L. et al. Use of the multi-allelic self-incompatibility in hoots obtained through haploid induction. In: Theoretical and Applied Genetics. 1998, vol. 96, p. 294-300.
240. Wan Y., Petolino J., Widholm J. Efficient production of doubled haploid plants through colchicines treatment of anther-derived maize callus. In: Theoretical and Applied Genetics, 1989, vol. 77, 889-892.
241. Wan Y. et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize cullus. In: Theoretical and Applied Genetics, 1991, vol. 81, p. 205-211.
242. Wan Y. et al. A novel transcriptomic approach to identify candidate genes for grain quality traits in wheat. In: Plant Biotechnology, 2009, vol. 7, p. 401-410.
243. Wedzony M., Rorer F., Geiger H. Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: XVIIth International Congress on Sex Plant Rep, Maria Curie-Sklodowska University Press, Lublin, 2002, p. 173.

244. Wei J., Chen M. Primary study on the natural fertility of maize haploids. In: *J. Maize Science*, 2006, vol. 14(2), p. 24-26.
245. Würschum T. et al. Mapping dynamic QTL for plant height in triticale. In: *BMC Genetics*, 2014, 15, p. 59. <http://dx.10.1186/1471-2156-15-59>. (vizitat: 21.03.2015).
246. Yahata M. et al. Evaluation of reproductive functions in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. In: *J. Japanese Society of Horticultural Science*, 2005, vol. 74, p. 281-288.
247. Yuan S. Study on the relationship between the haploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. In: *Agricultural Science China*, 2009, p. 939-946.
248. 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.
249. Zang Z. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). In: *Plant Cell Reproduction*, 2008, vol. 27. P.1851-1860.
250. Zhang J. et al. Mapping quantitative trait loci associated with arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa*). In: *New Phytology*, 2008, vol. 177, p. 350-355.
251. Zhang K. et al. Mapping QTLs with epistatic effects and *QTL x environment* interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat. In: *J. Genetics and Genomics*, 2008, vol. 35, p.119-127.
252. Zhang K. et al. Molecular genetic analysis of flour color using a doubled haploid population in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Euphytica*, 2009, vol.165, p. 471-484.
253. Zhou W., Hagberg P., Tang G. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. In: *Euphytica*, 2002, vol. 128, p. 27-34.
254. Zhou W., Tang G., Hagberg P. Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. In: *Plant Growth Regulatory*, 2002, vol. 37, p. 185-192.
255. Ziauddin A., Kasha K. Genetic stability in haploid cell cultures. In: *Haploids in crop improvement I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*: Springer, 1990, p. 83-98.

256.[http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr2:18,417,370..18,421,827;a=Chrchr2+LOCUS_LOOKUP+b1+18417370..18421827;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\"The%20estimated%20region%20for%20b1%20based%20on%20locus%20lookup\"+hilite=yellow](http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr2:18,417,370..18,421,827;a=Chrchr2+LOCUS_LOOKUP+b1+18417370..18421827;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\) (vizitat: 11.03.2015)

257.[http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr6:108,318,734..108,319,815;a=Chrchr6+LOCUS_LOOKUP+p11+108318734..108319815;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\"The%20estimated%20region%20for%20p11%20based%20on%20locus%20lookup\"+hilite=yellow](http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr6:108,318,734..108,319,815;a=Chrchr6+LOCUS_LOOKUP+p11+108318734..108319815;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\) (vizitat: 11.03.2015)

258.[http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr10:138,462,252..138,471,072;a=Chrchr10+LOCUS_LOOKUP+r1+138462252..138471072;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\"The%20estimated%20region%20for%20r1%20based%20on%20locus%20lookup\"+hilite=yellow](http://www.maizedb.org/gbrowse/maize_v2/?name=chr10:138,462,252..138,471,072;a=Chrchr10+LOCUS_LOOKUP+r1+138462252..138471072;style=LOCUS_LOOKUP+glyph=span+fgcolor=green+height=30+description=\) (vizitat: 11.03.2015).

ANEXE

Anexa 1. Acte de implementare în practică a rezultatelor științifice

INSTITUȚIE PUBLICĂ
INSTITUTUL DE FITOTEHNIIE
"PORUMBENI"



INSTITUTE OF CROP SCIENCE
"PORUMBENI"

4834, Republica Moldova
raionul Criuleni, s. Pașcani

Tel/fax: (37322) 24-55-71
e-mail: ifporumbeni@rambler.ru
www.porumbeni.md

4834, Republic of Moldova
district Criuleni, v. Pashcani

Nr. 015/224 din 16.04.15
La nr. _____ din _____

ACT

de implementare în practică a rezultatelor științifice

1. Denumirea propunerii de implementare: „ Linii cu capacitate de inducere *in vivo* a haploidiei la porumb”.
2. De cine și când a fost propusă: Sarmaniu Mariana, a.2012.
3. Unde a fost implementată: Laboratorul de ameliorare a porumbului pentru zonele nordice, Institutul de Fitotehnie „Porumbeni”.
4. Data implementării: aprilie, 2012.
5. Numărul de mostre: 3 inductori – LHI 2, LHI 3, LHI 7.
6. Rezultatele testării inductorilor LHI au demonstrat eficiență înaltă la obținerea plantelor haploide din diferite varietăți de porumb.
7. Eficacitatea implementării: accelerarea procesului de creare a liniilor homozigote din diverse genotipuri de interes genetic și ameliorativ.
8. Este recomandată: pentru programele de ameliorare a porumbului prin intermediul tehnologiei liniilor dublu haploide.

Directorul Institutului de Fitotehnie „Porumbeni”,
Doctor în agronomie


Pîrvan Pintilie

Responsabil pentru implementare
Dr. șt. agr., conferențiar cercetător


Boroza Pantelimon

ACADEMIA DE ȘTIINȚE
A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE GENETICĂ,
FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR

Str. Pădurii 20, Chișinău, MD-2002,
Republica Moldova
tel: (373-22) 770447, fax (373-22) 556180



ACADEMY OF SCIENCES
OF MOLDOVA
INSTITUTE OF GENETICS,
PHYSIOLOGY AND PLANT
PROTECTION

20 Padurii Str., Chisinau, MD-2002,
Republic of Moldova
tel: (373-22) 770447, fax (373- 22) 556180

20.07.15 nr. 309

E-mail: asm_igfpp@yahoo.com

la nr. _____ din _____

ACT

de implementare în practică a rezultatelor științifice

1. Denumirea propunerii de implementare: „Utilizarea inductorilor de haploidie la obținerea liniilor dublu haploide de porumb”.
2. De cine și când a fost propusă: Sarmaniu Mariana, a.2014.
3. Unde a fost implementată: laboratorul *Genetica rezistenței plantelor*.
4. Data implementării: aprilie, 2014.
5. Numărul de mostre: 3 (LHI 2, LHI 3, LHI 7).
6. Rezultatele utilizării inductorilor de haploidie: randamentul boabelor haploide obținute a crescut de la 8 la 10-15%.
7. Eficacitatea implementării: accelerarea procesului de creare a liniilor homozigote din diverse genotipuri de interes genetic și ameliorativ.
8. Este recomandată: pentru programele de ameliorare a porumbului prin intermediul tehnologiei liniilor dublu haploide.

Directorul Institutului de Genetică,
Fiziologie și Protecție a Plantelor

Vasile BOTNARI, dr. habilitat

Responsabil pentru implementare

Mihail MIHAILEV, dr., conf. cercet.

DECLARATIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Sarmanic Mariana, declar pe propria răspundere că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele, în conformitate cu legislația în vigoare.

Sarmanic Mariana

Semnătura:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sarmanic', is placed on a small rectangular piece of paper.

22 iulie 2015

CURRICULUM VITAE



Nume/Prenume: Sarmaniu Mariana

Data, luna, anul nașterii: 07.02.1984

Locul nașterii: s. Pohoarna, r-nul Șoldănești, Republica Moldova

Cetățenia: Republica Moldova

Studii:

2007-2010 - Doctorandă la Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM.

2006-2007 – Masterand la Universitatea de Stat, specialitatea Biologie.

2002-2006 - Universitatea de Stat, fac. Biologie și Pedologie, spec. Fiziologie vegetală.

1999-2002 - Liceul Teoretic Nr.1, s. Cotiujenii-Mari, r-nul Șoldănești, Republica Moldova.

1990-1999 - Școala Medie, s. Pohoarna, r-nul Șoldănești.

Domenii de activitate științifică: Genetică.

Activitatea profesională:

2013 - prezent – specialist principal Direcția Investigații Diagnostice, Î.S. Centrul de Carantină, Identificare, Expertize de Arbitraj și Dezinfectare a Producției.

2008 - prezent – cercetător științific la Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM).

2006-2008 – laborant superior la Catedra Biologie Vegetală, USM.

Participări la foruri științifice:

2008 – Conferința națională cu participare internațională: "Probleme actuale ale Geneticii, Fiziologiei și Ameliorării Plantelor, Chișinău;

2010 – Congresul al IX-lea Internațional al Societății Științifice a Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău;

2011 – Conferința „Genetica și Fiziologia rezistenței plantelor”, Chișinău;

2014 – Simpozionul Științific Internațional (100 ani de la nașterea distinsului savant și om de stat Mihail Sidorov), Chișinău;

2015 – Congresul al X-lea Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor din Republica Moldova, Chișinău.

Lucrări științifice publicate: autor și coautor la 14 lucrări științifice, dintre care 6 fără coautori, 6 - în cadrul Conferințelor internaționale.

Mențiuni: Bursa de excelență a Guvernului RM pentru anul 2010 (Hotărârea Guvernului nr.164 din 9 martie 2010).

Cunoașterea limbilor: română, rusă, engleză.

Date de contact: mun. Chișinău; tel. mobil: 069587815

e-mail: mariana.sarmaniuc@gmail.com