

MOȘTENIREA GENELOR *Rf* LA DIVERSE GENOTIPURI DE FLOAREA-SOARELUI

Maria DUCA, Angela PORT, Andrei MIDONI, Irina ANISIMOVA, Tudor ROTARU***

Catedra Biologie Vegetală

**Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

***AȘP MAGROSELECT, Soroca, Republica Moldova*

Research on four sources of pollen fertility restoration (I_1 - I_3 , F_1 , F_2 și BC_1) revealed that this character was controlled in three cases (*Drofa*, *Valentino* and *Sumbred 254*) by one single dominant gene and in one case (*Xenia*) by two non-allelic dominant genes *Rf*.

Succesul obținerii unor hibrizi cu productivitate înaltă prin utilizarea sistemului *ASC-Rf* (AndroSterilitate Citoplasmatică – Restaurare de Fertilitate) este determinat de capacitatea combinativă a liniilor consanguinizate, de tipul citoplasmei androsterile și de nivelul de restaurare a androfertilității de către liniile paterne.

Cel mai utilizat tip de *ASC* în practica de ameliorare a culturii de floarea-soarelui rămâne a fi PET1, care este obținut prin încrucișări interspecifice dintre *Helianthus petiolaris* Nutt. și *Helianthus annuus* L. [5] și este determinat de rearanjamente mitocondriale complexe [3,8], ce au generat un nou cadru de citire – *orf H522*, asociat cu apoptoza celulară [1,8].

Restaurarea fertilității polenului la floarea-soarelui este determinată de acțiunea unor factori ereditari dominanți (*Rf*) cu localizare nucleară, identificați pentru prima oară în populațiile spontane de floarea-soarelui [4], care se moștesc mendelian și manifestă o activitate variabilă în funcție de tipul de *ASC* [2,4,7,9,10].

Cercetarea modului de moștenire a restaurării fertilității este complicată de factorii ereditari complementari existenți în liniile fertile. Din aceste considerente, ne-am propus drept scop al acestor investigații analiza genetică a eredității factorilor restauratori de fertilitate în citoplasma PET 1, prin utilizarea fenotipurilor I_1 - I_3 , F_1 , F_2 și BC_1 , având ca obiectiv final determinarea numărului și tipului de interacțiune a genelor *Rf*.

Material și metode

Analiza hibridologică s-a realizat pe lotul experimental al Universității de Stat din Moldova pe parcursul a trei ani (2007-2009). Au fost studiați patru hibrizi de generația întâi: *Drofa*, *Valentino*, *Sumbred 254* și *Xenia* și genitorii acestora – liniile maternelle (*ASC*) și liniile paterne (*Rf*), oferite cu amabilitate de AȘP MAGROSELECT, Soroca, Republica Moldova (Fig.1). Variantele experimentale au fost amplasate după metoda parcelelor randomizate în blocuri. Fiecare parcelă a avut o suprafață de 39 - 40 m² (8-10 rânduri de plante, distanța de semănat a fost de 70 x 35 cm).

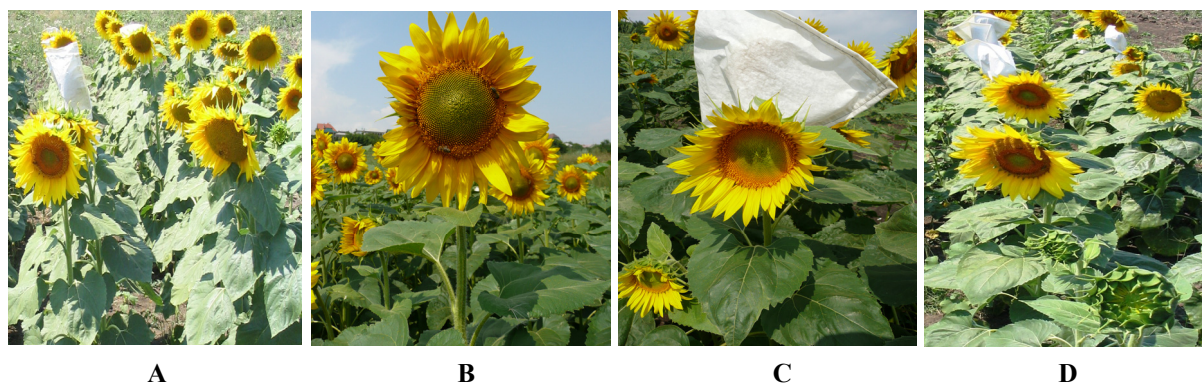


Fig.1. Hibrizii: A – *Drofa*; B – *Valentino*, C – *Sumbred 254* și D – *Xenia*.

Schema de încrucișare a inclus obținerea generației I_1 prin autopolenizarea liniilor fertile paterne, a hibrizilor de generația întâi (F_1) prin încrucișarea liniilor parentale, obținerea generațiilor F_2 și BC_1 de pe aceiași genitori fertili F_1 .

Fertilitatea polenului a fost apreciată vizual sau prin colorare cu soluție de 1% I₂ în KI (iod în iodură de potasiu) [6] la etapa când 75% din plante erau înflorite. Numărul de gene și tipul de interacțiune s-a realizat prin analiza raportului de plante fertile:sterile în toate generațiile menționate. Autenticitatea rezultatelor obținute a fost apreciată conform testului χ^2 [11].

Rezultate și discuții

Manifestarea genelor *Rf* la liniile homozigote consangvinizate. Liniile homozigote (*ASC* și *Rf*) luate în studiu au prezentat un grad înalt de uniformitate morfoanatomică și funcțională. Astfel, în cazul liniilor maternelor doar 3% din numărul total de plante au fost fertile, care pot fi considerate impurități mecanice. Cel mai înalt procent de impurități a fost atestat la linia *Valentino ASC* (7%).

Analiza liniilor paternelor a scos în evidență o capacitate înaltă de formare a polenului și un procent mic de impurități care s-a manifestat preponderent la linia *Drofa Rf* (0,8%), spre deosebire de *LC 637 Rf* și *Xenia Rf* la care nu au fost observate plante sterile. Datele obținute confirmă un grad înalt de puritate genetică a liniilor studiate.

Restaurarea androfertilității la hibridii de generația întâi. Tabloul general și complex al geneticii restaurării androfertilității s-a conturat începând cu analiza hibridilor *F₁*, pentru a căror obținere au fost utilizate diferite linii restauratoare de fertilitate. Astfel, hibridii rezultați în urma încrucișării acestora cu formele androsterile au demonstrat un potențial de restaurare a fertilității polenului printr-un raport total de 1119 plante fertile : 14 plante sterile (Tab.2). Întrucât numărul genotipurilor sterile este foarte mic în comparație cu cele fertile, putem considera că acestea reprezintă impurități biologice sau mecanice și că toate plantele au manifestat o restaurare totală a androfertilității citoplasmice, ceea ce demonstrează că genotipurile *F₁* sunt uniforme și heterozigote după genele restauratoare de fertilitate a polenului.

Tabelul 2

Analiza fenotipică a plantelor la genotipurile hibride *F₁*

Raportul numărului de plante fertile : sterile					
Anul de investigații		<i>Xenia F₁</i>	<i>Drofa F₁</i>	<i>Valentino F₁</i>	<i>Sumbred 254 F₁</i>
		2007	92:2	92:4	60:2
2008	98:2	86:2	136:0	102:0	
2009	64:0	104:0	94:0	98:0	
În total		254:4	282:6	290:2	293:2

Analiza hibridilor de generația întâi atestă prezența genelor restauratoare de fertilitate la toate liniile homozigote analizate, care au servit drept formă paternă.

Ulterior, pentru a determina numărul și tipul de interacțiune dintre genele *Rf*, a fost efectuată autopolenizarea hibridilor de generația întâi (*F₂*) și, concomitent, încrucișarea acestora cu formele androsterile (*BC₁*).

Cele mai simple mecanisme de restaurare a androfertilității au fost remarcate în cadrul a trei combinații hibride: *Valentino*, *Drofa* și *Sumbred 254*. Astfel, raportul fenotipurilor fertile : sterile în generația *F₂* atât al descendenților unei singure plante, cât și cel total, remarcat prin valorile 315:99 – *Valentino F₂* și 180:64 – *Drofa*, demonstrează o segregare fenotipică conform raportului teoretic de 3:1, care pune în evidență prezența unei singure gene *Rf* implicate în restaurarea fertilității polenului (Tab.3,4).

Tabelul 3

Moștenirea genelor restauratoare de fertilitate în ASC PET 1 (*F₂*) hibridul *Valentino*

Raportul teoretic așteptat		Numărul de plante			
după genotip	după fenotip	<i>Valentino F₂-1</i>	<i>Valentino F₂-2</i>	<i>Valentino F₂-3</i>	<i>Valentino F₂</i>
1 <i>Rf₁Rf₁</i> 2 <i>Rf₁rf₁</i>	3 fertile	115	106	94	315
1 <i>rf₁rf₁</i>	1 sterile	35	34	30	99
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		0,22	0,04	0,04	0,26

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Tabelul 4

**Moștenirea genelor restauratoare de fertilitate în ASC PET 1 (F_2)
hibridul *Drofa***

Raportul teoretic așteptat		Numărul de plante		
după genotip	după fenotip	<i>Drofa F₂₋₁</i>	<i>Drofa F₂₋₂</i>	<i>Drofa F₂</i>
1 Rf ₁ Rf ₁ 2 Rf ₁ rf ₁	3 fertile	84	96	180
1 rf ₁ rf ₁	1 sterile	30	34	64
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		0,01	0,09	0,20

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Încrucișări analizatoare repetate ale hibridilor de generația întâi cu formele sterile a pus în evidență aceeași constatare privind prezența unei singure gene responsabile pentru restaurarea androfertilității, confirmată prin raportul teoretic de segregare fenotipică 1: 1 (Tab.5,6).

Tabelul 5

**Moștenirea genelor restauratoare de fertilitate în ASC PET 1 (BC_1)
hibridul *Valentino***

Raportul teoretic așteptat		Numărul de plante		
după genotip	după fenotip	<i>Valentino Fa-1</i>	<i>Valentino Fa-2</i>	<i>Valentino BC₁</i>
1 Rf ₁ rf ₁	1 fertile	55	65	120
1 rf ₁ rf ₁	1 sterile	70	60	130
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		1,80	0,20	0,40

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Tabelul 6

**Moștenirea genelor restauratoare de fertilitate în ASC PET 1 (BC_1)
hibridul *Drofa***

Raportul teoretic așteptat		Numărul de plante			
după genotip	după fenotip	<i>Drofa Fa-1</i>	<i>Drofa Fa-2</i>	<i>Drofa Fa-3</i>	<i>Drofa BC₁</i>
1 Rf ₁ rf ₁	1 fertile	55	64	60	179
1 rf ₁ rf ₁	1 sterile	70	68	55	193
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		1,80	0,12	0,21	0,52

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Rezultate similare au fost obținute și în generația F_2 și BC_1 pentru hibridul *Sumbred 254* (Tab.7).

Tabelul 7

**Segregarea după caracterul restaurării androfertilității la floarea-soarelui în diferite generații
cu utilizarea hibridului *Sumbred 254***

Generația	Raportul numărului de plante fertile : sterile		χ^2 pentru raportul teoretic așteptat
	real	teoretic	
<i>Sumbred 254 F₁₋₁</i>	97:1	1:0	0,01
<i>Sumbred 254 F₂₋₁</i>	85:30	3:1	0,07
<i>ASC</i> × <i>Sumbred 254</i> (BC_{1-1})	70:66	1:1	0,11
<i>Sumbred 254 F₁₋₂</i>	49:1	1:0	0,02
<i>Sumbred 254 F₂₋₂</i>	100:22	3:1	3,24
<i>ASC</i> × <i>Sumbred 254</i> (BC_{1-2})	39:34	1:1	0,34

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Astfel, analiza numărului de plante fertile și sterile atât în cazul hibridilor de generația a doua, cât și în cadrul încrucișărilor analizatoare repetate demonstrează prezența unei singure gene restauratoare de fertilitate la combinațiile hibride de *Drofa*, *Valentino* și *Sumbred 254*.

În același timp, studiul combinației hibride *Xenia* a manifestat o ereditate mai complexă a caracterului cercetat.

În generația a doua F_2 a fost depistat un raport de segregare fenotipică de 15 fertile:1sterile, ceea ce corespunde rezultatului teoretic așteptat în cazul prezenței a două gene cu efect necumulativ (Tab.8). Aceste 2 clase fenotipice de plante la hibridii de generația a doua include patru genotipuri cu următorul raport de segregare – $9 Rf_1.Rf_2. : 3 Rf_1.rf_2rf_2 : 3 rf_1rf_1Rf_2. : 1 rf_1rf_1rf_2rf_2.$

Tabelul 8

Interacțiunea a două gene *Rf* după tipul polimeriei necumulative în F_2 la hibridul *Xenia*

Interacțiunea genelor și raportul teoretic așteptat		Numărul de plante		
după genotip	după fenotip	<i>Xenia F₂-1</i>	<i>Xenia F₂-2</i>	<i>Xenia F₂</i>
9 Rf_1-Rf_2- 3 $Rf_1.rf_2rf_2$ 3 $rf_1rf_1Rf_2.$	15 fertile	56	75	131
1 $rf_1rf_1rf_2rf_2$	1 sterile	4	7	11
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		0,01	0,73	0,54

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Raportul de segregare fenotipică de 3:1 al plantelor fertile și sterile din generația BC_1 confirmă prezența a două gene *Rf* nealele dominante, care acționează după tipul polimeriei necumulative (Tab.9). Segregarea fenotipică de 3:1 rezultată în urma încrucișării hibridului de generația întâi cu formele sterile determină un raport de segregare genotipică de $1 Rf_1rf_1Rf_2rf_2 : 1 Rf_1rf_1rf_2rf_2 : 1 rf_1rf_1Rf_2rf_2 : 1 rf_1rf_1rf_2rf_2.$

Interacțiunea de tipul polimeriei (cumulativă sau necumulativă) este corelată cu efectul cantitativ și manifestarea fenotipică depinde de doza genelor dominante *Rf*. La analiza combinației hibride *Xenia* (F_2 și F_a) au fost observate doar două clase de indivizi – cu productivitate normală a polenului și complet sterili, relevând astfel că restaurarea androfertilității citoplasmatică nu depinde de prezența unei sau a ambelor gene restauratoare în stare homo- sau heterozigotă.

Tabelul 9

Interacțiunea a două gene *Rf* după tipul polimeriei necumulative în F_a la hibridul *Xenia*

Interacțiunea genelor și raportul teoretic așteptat		Numărul de plante		
după genotip	după fenotip	<i>Xenia Fa-1</i>	<i>Xenia Fa-2</i>	<i>Xenia Fa</i>
1 $Rf_1rf_1Rf_2rf_2$ 1 $Rf_1rf_1rf_2rf_2$ 1 $rf_1rf_1Rf_2rf_2$	3 fertile	112	60	172
1 $rf_1rf_1rf_2rf_2$	1 sterile	32	18	50
χ^2 pentru raportul teoretic așteptat		0,59	0,15	0,73

$$\chi^2_{0,05} = 3,84$$

Concluzii

Datele primite demonstrează că mecanismul de restaurare a androsterilității masculine în *ASC PET 1* are o natură genetică complexă și este asigurat în unele genotipuri de prezența unei singure gene restauratoare de fertilitate, iar în alte cazuri – de două sau mai multe gene *Rf* cu interacțiune polimeră.

Referințe:

- Balk J., Leaver C.J. The PET1–CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release // *Plant Cell.*, 2001, vol.13, p.1803-1818.
- Duca M. Aspecte genetice și fiziologice ale sistemului *ASC-Rf* la *Helianthus annuus* L.: Autoreferatul tezei de doctor habilitat în biologie. - Chisinau, 1998.

3. Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development // The Plant Cell., 2004, vol.16, p.154-169.
4. Kinman M.L. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs // Proc. Fourth Int. Sunflower Conference. U.S.A., Memphis Tennessee, 1970, p.181-183.
5. Leclercq P. Une sterilité male utilisable pour la production d'hybrides simples de tournesol // Ann. Amélior. Pl., 1966, vol.18, p.307-315.
6. Midoni A. Mecanisme sporofitice și gametofitice de restaurare a fertilității // Studia Universitatis, 2008, nr.12, p.16-18.
7. Vranceanu A.V., Stoenescu F.M. Experimentation of sunflower hybrids in international trials (1976 and 1977) // Helia, 1978, vol.1, p.10-20.
8. Zhang Z., Tang W., Zhang F., Zheng Y. Fertility Restoration Mechanisms in S-Type Cytoplasmic Male Sterility of Maize (*Zea mays* L.) Revealed Through Expression Differences Identified by cDNA Microarray and Suppression Subtractive Hybridization // Plant Molecular Biology Reporter, 2005, vol.23, p.17-38.
9. Анащенко А.В., Дука М. В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение III. Восстановление мужской фертильности у гибридов на основе ЦМС₁ // Генетика 1985а, №12, с.1999-2004.
10. Анащенко А.В., Дука М.В. Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Генетика, 1985b, т.21, №12, с.2005-2010.
11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. - Москва: Колос, 1979.

Prezentat la 02.11.2009