

CZU 633.854.78:631.527.56

EVALUAREA GRADULUI DE STERILITATE LA FLOAREA-SOARELUI

Tatiana ȘESTACOVA¹, Ion GÎSCĂ², Aliona CUCEREAVÎP, Olesia TABĂRĂ¹

¹ Universitatea Academiei de Științe a Moldovei

² „AMG – Agroselect” SRL

Abstract. Cytoplasmic male sterility (CMS) is an indispensable and necessary tool for obtaining sunflower hybrids. The monitoring of seed quality regarding male sterility is an important element in achieving a high efficiency of hybridization based on CMS-*Rf* systems. In this study six maternal sunflower lines have been evaluated for the degree of male sterility in laboratory conditions, using molecular biology techniques, as well as in the experimental field, using classical methods. The PCR reaction revealed the presence of *orfH522* gene associated with CMS in sunflower. The 321-pb amplicon generated with specific primers designed for this gene was identified in all analyzed samples. Five of the six maternal lines presented a maximum level (100%) of sterility. Field tests involved traditional counting of fertile and sterile plants according to flower morphology. The obtained data in both cases were similar, which proves that the use of molecular analysis techniques in diverse researches offers advantages in reducing time and resources.

Key words: *Helianthus annuus*; Cytoplasmic male sterility; Degree of sterility; Hybrids; Molecular markers.

Rezumat. Androsterilitatea citoplasmatică (ASC) este un instrument indispensabil și necesar pentru obținerea hibridilor de floarea-soarelui. Astfel, monitorizarea calității semințelor privind sterilitatea masculină reprezintă un element important în obținerea unui randament înalt de hibridizare bazat pe sistemele ASC-*Rf*. În acest context a fost evaluat gradul de sterilitate la 6 linii materne de floarea-soarelui în condiții de laborator, prin tehnici de biologie moleculară și în câmpul experimental, utilizând metode clasice. Reacția PCR a constatat prezența genei *orfH522* asociată cu androsterilitatea la floarea-soarelui. Ampliconul de 321 pb, generat cu primeri specifici pentru această genă, a fost identificat la toate probele analizate. Cinci dintre cele șase linii materne au prezentat un nivel maxim (100%) de sterilitate. Testele din câmp au implicat metode tradiționale de numărare a plantelor fertile și sterile în conformitate cu morfologia florii. Rezultatele obținute în ambele cazuri au fost similare, ceea ce demonstrează că utilizarea tehnicilor de analiză moleculară în diferite cercetări are avantaje de aplicare datorită reducerii timpului și resurselor.

Cuvinte-cheie: *Helianthus annuus*; Androsterilitate citoplasmatică; Grad de sterilitate; Hibridi; Markeri moleculari.

INTRODUCERE

Pentru obținerea recoltelor performante de floarea-soarelui, amelioratorii pun accentul pe elaborarea hibridilor cu creștere viguroasă (efect de heterozis), valorificarea diversității genetice și utilizarea sistemului ASC-*Rf* (androsterilitate citoplasmatică – restaurare de fertilitate) în crearea formelor parentale pentru a atinge nivelul maxim (100%) de heterozigoție.

Prima sursă de androsterilitate citoplasmatică (ASC) la floarea-soarelui a fost descoperită de Leclercq în 1966 în urma încrucișării interspecifice dintre speciile sălbatice, filogenetic îndepărtate *Helianthus petiolaris* Nutt. și *Helianthus annuus* L. (Leclercq, P. 1969). Această sursă de androsterilitate, numită PET1, este folosită pe larg în practica de ameliorare și producere a florii-soarelui (Vrânceanu, A. V. 2000; Ispas, I. 2002). Utilizarea exclusivă a PET1-ASC pentru obținerea de semințe hibride a contribuit la micșorarea variabilității germoplasmei (Lesnic, V. et al. 2004; Duca, M. et al. 2005; Duca, M. et al. 2013) cu pierderea unor caractere agronomice valoroase (Christov, M. 1993), creșterea vulnerabilității față de condițiile variate ale mediului (Dhillon, M.K. et al. 2006) și la dificultăți privind restaurarea maximală a androfertilității (Kukoš, M.V. 1982; Khan, M.S. 2005).

Până în prezent au fost identificate 72 de surse de ASC (Serieys, H. 2005). Utilizarea lor în ameliorare este limitată de faptul că doar pentru jumătate dintre ele se cunosc gene restauratoare de fertilitate (Serieys, H. 2005). Mai mult ca atât, în funcție de sursa de ASC, plantele F₁ se caracterizează printr-o normă de reacție și o stabilitate variată a gradului de sterilitate (Anașenko, A. V. 1968; Anașenko, A. V. 1971). Nivelul de sterilitate al surselor de ASC și al hibridilor generați de acestea depinde de condițiile mediului extern, androsterilitatea de tip lenticularis fiind mai puțin stabilă (Duca, M. 1998). Deși s-a observat prevalarea efectelor nucleare asupra celor citoplasmatică și puternice interacții nucleu-

citoplasmă (Christov, M. 1993) la hibridii de prima generație creați cu utilizarea a 13 surse de ASC, s-a stabilit că ponderea citoplasmei în manifestarea androsterilității-androfertilității este considerabilă (Anașenko, A.V. et al. 1984).

Astfel, pentru păstrarea germoplasmei și diversificarea materialului inițial din colecțiile de floarea-soarelui, unul dintre obiectivele majore în strategiile de ameliorare la heterozis este includerea diferitor surse de ASC cu un nivel stabil de manifestare a androsterilității. Utilizarea suplimentară a tehnicilor de biologie moleculară și a markerilor moleculari, de rând cu metodele clasice, pot eficientiza și accelera etapele programelor de ameliorare (Gupta, P.K. et al. 1999; Korzun, V. 2003).

Din aceste considerente, scopul cercetărilor noastre a constat în evaluarea comparativă a gradului de sterilitate masculină la 6 genotipuri maternelor de floarea-soarelui, ceea ce s-a realizat cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară combinate cu experimentul în câmp.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul utilizat în cercetare a inclus 6 genotipuri cu ASC: MS-2077A, MS-2067A, MS-2091A, MS-2098A, MS-2039A, MS-589A din colecția „AMG – Agroselect” SRL.

Semințele de floarea-soarelui au fost crescute în vase de vegetație până la etapa de două frunze cotiledonale, servind ulterior în calitate de material inițial pentru extragerea ADN-ului. Pentru fiecare genotip s-au colectat 100 de probe care au fost păstrate la -80°C .

Pentru cercetările în câmp, genotipurile au fost cultivate pe suprafețe geografic izolate de alte culturi de floarea-soarelui, cu dimensiuni între 3,3 și 16,0 hectare. Câmpurile de multiplicare se caracterizează printr-o izolare în spațiu de 3000–3500 m față de alte câmpuri semănate cu floarea-soarelui. Ca premergători au servit cerealele păioase și porumbul.

Semănatul s-a efectuat în termeni optimi, cu distanța de 70 cm între rânduri. Pe toată perioada înfloritului s-a numărat și controlat forma maternă la sterilitate.

Extragerea probelor de ADN pentru analiza prezenței genei *orfH522* asociată cu ASC s-a realizat cu reagentul CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), conform metodei standard (Doyle, J. J. et al. 1990). Estimarea purității și calității probelor a fost efectuată cu ajutorul spectrofotometrului T60 UV-VIS Spectrophotometer (PG Instruments limited), prin calcularea raportului $\lambda 260/\lambda 280$, care a fost în limita valorilor 1,8–2,0, iar conținutul ADN în probă a variat între 230–800 ng/ μl .

Reacția PCR s-a realizat cu ajutorul primer-ilor specifici elaborați anterior prin programul Primer3 pentru *orfH522* ($5'-3'$) (Duca, M. et al. 2006): sens GGCGCACTCTCTTTTCTGT și antisens CTTGAATGGCAGTGGTGATG. Mediul de reacție PCR a inclus: 25–50 ng ADN, 0,5 μM fiecare primer, dNTP 200 μM , MgCl_2 2 mM, DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) 1 U/reacție, volumul total 25 μl . A fost utilizat amplificatorul GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) cu următorul program: 3 min 95°C urmat de 30 cicluri: 30 s la 95°C , 30 s la 60°C , 20 s la 72°C ; elongare finală 3 min la 72°C .

Ampliconii au fost vizualizați în gel de agaroză de 1% cu etidium bromid (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) în prezența markerului de masă moleculară GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific), utilizându-se soluția-tampon TAE (Tris-acetat EDTA) la tensiunea de 120–40 V.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Productivitatea hibridilor de floarea-soarelui este direct legată de starea materialului semincer. Obținerea formelor parentale și a semințelor F_1 biologic pure și de calitate superioară, care să respecte structura genetică originală, necesită realizarea semănatului în spații izolate la o distanță de 1500 m față de alte populații de floarea-soarelui (Vronskih, M.D et al. 1983), iar obținerea unui grad înalt de hibridare presupune un nivel de 100% de androsterilitate.

Prin urmare, evaluarea gradului de sterilitate reprezintă un proces de ameliorare continuu, laborios și costisitor din punct de vedere financiar, ce se realizează în condiții experimentale, în câmp sau în sere, prin examinarea inflorescențelor.

Astfel, evaluarea comparativă a gradului de sterilitate masculină la genotipurile maternelor de floarea-soarelui studiate (Fig. 1) s-a realizat prin tehnicile de analiză moleculară, combinate cu experimentul în câmp.



Figura 1. Aspectul exterior al inflorescenței la genotipurile studiate

Androsterilitatea poate fi evaluată cu succes cu ajutorul tehnicii PCR în baza primerilor specifici pentru secvența *orfH522*, care determină manifestarea fenotipică a androsterilității la floarea-soarelui, astfel făcând posibilă estimarea gradului de sterilitate în germoplasma diferitor linii. Primerii utilizați generează un amplicon de 321 pb, care demonstrează sterilitatea plantei (Fig. 2).

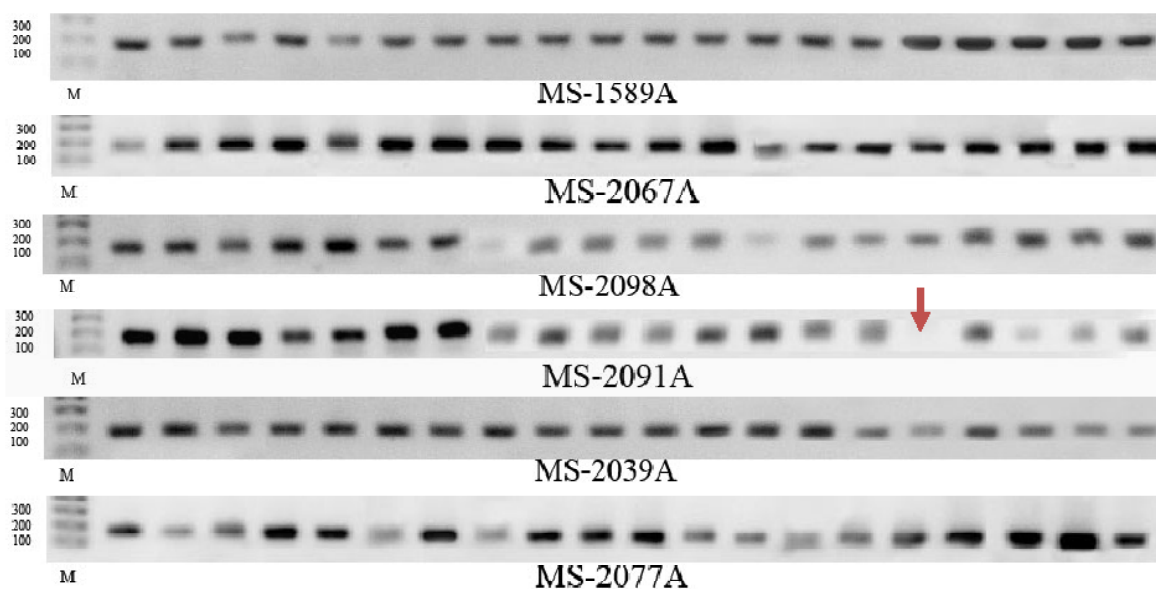


Figura 2. Gradul de sterilitate a liniilor materne evaluat în laborator
(sunt expuse rezultatele pentru 20 plante dintre 100 evaluate)

Datele obținute au pus în evidență ampliconul așteptat la toate probele analizate. Cinci dintre cele șase linii materne (MS-2077A, MS-2067A, MS-2098A, MS-2039A, MS-1589A) prezintă un nivel maxim (100%) de sterilitate (Fig. 2). Datele obținute în laborator corelează perfect cu cele observate la plantele din câmp (Tab. 1).

Pentru linia MS-2091A, gradul de sterilitate estimat în laborator a constituit 99,0 %, fiind mai mic cu 0,9% comparativ cu cel determinat în câmp. Diferența constatată nu depășește limita semnificativă a erorilor, astfel demonstrându-se că aceste metode pot fi utilizate separat sau complementar pentru

Tabelul 1. Gradul de sterilitate evaluat în condiții de câmp

Nr.	Genotipul	Plante evaluate în câmpul experimental			Gradul de sterilitate evaluat în laborator (100 plantule), %
		Fertile	Sterile	Gradul de sterilitate, %	
1.	MS – 2077A	1	999	99,9	100
2.	MS – 2067A	0	1000	100	100
3.	MS – 2091A	1	999	99,9	99,0
4.	MS – 1589A	0	1000	100	100
5.	MS – 2039A	0	1000	100	100
6.	MS – 2098A	0	1000	100	100

estimarea nivelului de sterilitate a genotipurilor utilizate la sectoarele de multiplicare a liniilor materne, pentru obținerea semințelor de elită, sau la sectoarele de hibridare, pentru obținerea hibrizilor F₁.

Rezultatele analizelor moleculare obținute în cadrul cercetărilor indică asupra prezenței restructurărilor de tip *orfH522* în genomul mitocondrial, fără diferențierea genotipurilor homozigote de cele heterozigote (hibrizii). Genotipurile hibride create în baza de ASC PET1, similar formelor ASC se caracterizează prin prezența ampliconului de 321 pb, materialul genetic citoplasmatic moștenindu-se pe linia maternă.

CONCLUZII

Primerii specifici genei *orfH522* pot fi utilizați cu succes în stabilirea prezenței androsterilității citoplasmice la liniile de floarea-soarelui. Reușita implementării unor astfel de metode de control în programele de selecție asigură utilizarea cu succes a plantelor cu ASC ca un mijloc relativ ieftin de obținere a hibrizilor înalt productivi cu un grad sporit de puritate.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ANAȘENKO, A.V. (1971). Osobennosti vyrașivaniâ podsolnečnika pri himičeskoj kastracii. V: Selekcii i semenovodstvo, №2, s. 36-38. ISSN 0037-1459.
2. ANAȘENKO, A.V., KUKOŠ, M.V. (1984). Stepen' vosstanovleniâ mužskoj fertil'nosti u gibridov podsolnečnika v zavisimosti ot tipa CMS i uslovij sredy. V: Doklady VASHNIL, nr 9, s. 9-12.
3. ANAȘENKO, A.V. (1968). Mužskaâ steril'nost' u podsolnečnika (*Helianthus annuus* L.): avtoref. dis. kand s-h nauk. Leningrad. 22 s.
4. CHRISTOV, M. (1993). Sources of cytoplasmic male sterility produced at IWS "Dobroudja". In: Biotechnology & Biotechnological Equipment, vol. 7, nr. 4, pp. 132-135. ISSN 1310-2818.
5. DHILLON, M.K., SHARMA, H.C., NARESH, J.S. et al. (2006). Influence of cytoplasmic male sterility on expression of different mechanisms of resistance in sorghum to *Atherigona soccata* (Diptera: Muscidae). In: Journal of economic entomology, vol. 99, nr. 4, pp. 1452-1461. ISSN 0022-0493.
6. DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. In: Focus, vol. 12, pp. 13-15.
7. DUCA, M., CĂPĂȚĂNĂ, A., PORT, A., BARBACARU, N. (2005). The estimation of heterosis effect based on molecular analysis (RAPD) in sunflower. Genetic polymorphism in homo- and heterozygote genotypes of sunflower. In: Romanian Journal of Genetics, vol. 1, nr. 2, pp. 22-31. ISSN 1841-2513.
8. DUCA, M., PORT, A., OROZCO-CARDENAS, M.L., LOVATT, C. (2006). Mecanisme moleculare ale androsterilității ereditare și induse la floarea-soarelui. In: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții, nr. 1, pp. 86-93.
9. DUCA, M., PORT, A., ȘESTACOVA, T., SINIAVSKAYA, M., AKSYONOVA, E., DAVYDENKO, O. (2013). Microsatellite marker application in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Fingerprinting. In: Biotechnology & Biotechnological Equipment, vol. 27, nr. 3, pp. 3772-3775. ISSN 1310-2818; DOI: 10.5504/BBEQ.2013.0021.
10. DUCA, M. (1998). Aspecte genetice și fiziologice ale sistemului ASC-Rf la *Helianthus annuus* L.: autoref. tz. doct. habilitat în biologie. Chișinău. 40 p.
11. GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C., RAMESH, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. In: Plant Breed., vol. 118, nr. 5, pp. 369-390. ISSN 0179-9541.
12. ISPAS, I. (2002). Aspecte moleculare privind citoplasma androsterilă PET1 de la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.), pp. 51-70 [accesat 05.02.2014]. Disponibil: <http://ebooks.unibuc.ro/biologie/biotehnologie/articolul5.pdf>

13. KHAN, M.S. (2005). Engineered male sterility. In: Nature, vol. 436, nr. 7052, p. 78. ISSN 0028-0836.
14. KORZUN, V. (2003). Molecular markers and their application in cereals breeding. In: Electronic Forum on Biotechnology in Food and Agriculture: MAS workshop held prior to Conference 10, pp. 18-22 [accesat 05.02.2015]. Disponibil: <http://www.fao.org/biotech/docs/korzun.pdf>.
15. KUKOŠ, M.V. (1982). Selekcionnaâ cennost' nekotoryh vosstanovitelej fertil'nosti pyl'cy u podsolnečnika. V: Bûll. VNII Rastenievodstva. Leningrad, vyp. 118, s. 29-31.
16. LECLERCQ, P. (1969). Une sterilité male chez le tournesol. In: Ann. Amelior. Plant. (Paris), nr. 19, pp. 99-106.
17. LESNIC, V., CHIABURU, I., POSTOLATI, N. (2004). Producerea semințelor hibride de floarea-soarelui în Rep.Moldova. In: Cultura plantelor de câmp – rezultate și perspective: tezele conf. intern., Bălți, 24-25 iun. 2004, pp. 153-155. ISBN 9975-9544-3-X.
18. SERIEYS, H. (2005). Identification, study and utilization in breeding programs of new cms sources. In: FAO Subnetwork: Proc. sunflower Subnetwork progress report, 17-20 July 2005, FAO, Rome, Italy, pp. 47-53.
19. VRÂNCEANU, A.V. (2000). Floarea-soarelui hibridă. București: Ceres. 1148 p. ISBN 973-40-0453-0.
20. VRONSKIĖ, M.D., LESNIK, V.S., BUČUČANU, M.I. (1983). Sozdanie specializirovannyh zon semenovodstva gibridnogo podsolnečnika: opyt i problemy. V: Selekcîa i semenovodstvo, № 2, s. 31-34. ISSN 0037-1459.

Data prezentării articolului: 15.10.2014

Data acceptării articolului: 05.03.2015