

## AGRONOMIE ȘI ECOLOGIE

CZU 633.15:575.224.234.2

### EXPRESIA FENOTIPICĂ A GENEI *OPAQUE-2* LA PORUMBUL TETRAPLOID

**GR. BATÎRU**

*Universitatea Agrară de Stat din Moldova*

**Abstract.** In this study we aimed to analyze the segregation pattern of the gene *opaque-2* in tetraploid maize of  $F_2$  generation obtained by self-pollination of duplex heterozygotes. We also analyzed if there are any changes in the fraction quota of the grain due to the mutant gene. The obtained results showed random chromosomal segregation of the gene *opaque-2* with a phenotypic ratio of 35:1 in the  $F_2$  generation confirmed by the chi-test ( $\chi^2$ ), which generated a value of 0.055. The analysis of grain fractions revealed a higher embryo and lower endosperm quotas in the mutant grains compared with the normal ones, though at insignificant level ( $P > 0,05$ ).

**Key words:** Zea mays; Tetraploids;  $F_2$  hybrids; Mutation; Recessive genes; *Opaque-2*; Gene expression; Segregation; Grain; Anatomical structure.

**Rezumat.** Se prezintă analiza modelului de segregare a genei *opaque-2* la porumbul tetraploid în generația a doua ( $F_2$ ) obținută prin autopolenizarea unui heterozigot duplex. De asemenea, s-a studiat dacă există modificări ale cotei fracțiilor bobului datorită genei mutante. Rezultatele obținute au arătat că gena *opaque-2* a segregat în generația  $F_2$  după modelul cromozomal aleatoriu într-un raport fenotipic de 35:1 confirmat de testul chi ( $\chi^2$ ), care a generat o valoare de 0,055. Analiza fracțiilor bobului a relevat o cotă mai mare a embrionului și una mai redusă a endospermului în boabele mutante, comparativ cu cele normale, deși la nivel nesemnificativ ( $P > 0,05$ ).

**Cuvinte cheie:** Zea mays; Tetraploizi; Hibridi  $F_2$ ; Mutație; Gene recesive; *Opaque-2*, Expresia genelor; Segregare; Boabe; Structură anatomică.

### INTRODUCERE

Cercetarea cariotipului la diverse specii și genuri vegetale a relevat faptul că multe dintre acestea sunt poliploide, adică posedă seturi multiple de cromozomi sau genomuri (3x, 4x, 5x, etc.) (Tate, J.A. et al., 2005). Poliploidizii pot apărea spontan datorită unor anomalii în procesul de diviziune a celulelor, dar și pe cale experimentală prin folosirea unor agenți poliploidizanți (Palii, A. 1998). La diploidizii normali (2x) în meioză se formează bivalenți (o tetradă de cromatide), iar la tetraploizi (4x), din cauza omologiei cromozomale, dintre cele patru seturi, în profaza I a meiozei apar tetravalenți (o octadă de cromatide). Ereditatea caracterelor la formele tetraploide ale plantelor este mai complexă decât la cele diploide datorită prezenței a 5 genotipuri după fiecare locus (AAAA ( $A^4$ ) – quadriplex, AAAa ( $A^3a$ ) – triplex, AAaa ( $A^2a^2$ ) – duplex, Aaaa ( $Aa^3$ ) – simplex, aaaa ( $a^4$ ) – nuliplex), în dependență de combinațiile diferite a trei tipuri de gameți (AA, Aa, aa), raportul cărora este determinat, în mare măsură, de genotipul formelor parentale, dar și de comportamentul citologic al cromozomilor și cromatidelor în meioză (Savčenko, V.K. 1976).

Segregarea tetraploidului duplex  $A^2a^2$ , la care genele sunt plasate pe cromozomi atât de aproape de centromer încât nu are loc crossing-over, iar cei 4 cromozomi se separă câte doi, este determinată de tipurile de gameți 1AA:4Aa:1aa, prin combinarea cărora se formează raportul genotipic de segregare de  $1A^4:8A^3a:18A^2a^2:8Aa^3:1a^4$  și raportul fenotipic de 35A:1a. Acest tip de segregare se numește cromozomală aleatorie. Dacă, însă, vom ține seama că la tetraploizi cei 4 cromozomi omologi sunt, de fapt, formați din 8 cromatide, la un genotip heterozigot  $A^2a^2$  se formează următoarele tipuri de gameți: 3AA:8Aa:3aa, prin combinarea cărora se realizează următoarele genotipuri:  $9A^4$ ,  $48A^3a$ ,  $82A^2a^2$ ,  $48Aa^3$  și  $9a^4$ . În acest caz, după fenotip, segregarea se produce astfel: 187A:9a, adică aproximativ 21:1 – segregarea, fiind numită cromatidică aleatorie (Serbak, V.S. 1971; Savčenko, V.K. 1976).

Scopul cercetării constă în analiza monohybridă la formele tetraploide de porumb urmărind ereditatea mutației *opaque-2* ( $o_2$ ), care se folosește pe larg în cercetările de genetică și în programele de ameliorare a calității bobului.

## MATERIAL ȘI METODĂ

În vederea cercetării eredității mutației  $o_2$  la nivelul porumbului tetraploid, în calitate de material inițial, a fost utilizat sinteticul B tetraploid cu endospermul sticlos al boabelor și formele tetraploide homozigote  $o_2$  cu endospermul făinos (opac) obținute în experiențele noastre prin tratare cu colchicină (Palii, A., Batîru, G. 2011). În urma încrucișării formelor tetraploide  $o_2$  cu sinteticul B în  $F_1$  au fost obținute combinații hibride heterozigote duplex după gena  $o_2$ , iar în anul 2012, prin autopolenizarea acestor combinații a fost obținută generația a doua ( $F_2$ ).

Știuleții dezvoltăți în rezultatul autopolenizării au fost curățiți de boabe, iar boabele analizate după fenotip pe masa iluminată. Pentru boabele normale lumina se trece prin endosperm și ele apar sticloase pe fundal luminos. Cele ce posedă gena *opaque-2* sunt intransparente, opace. Astfel, a fost efectuată distribuirea boabelor în cele două clase fenotipice (sticloase și opace). Pentru a stabili dacă datele obținute se încadrează în limitele legilor mendeliene de segregare, am aplicat testul  $\chi^2$  (chi), care permite să fie comparată distribuția teoretică a claselor fenotipice cu cea experimentală.

Determinarea cotei fracțiilor boabelor a fost realizată prin separarea fiecărei fracții după înmuierea boabelor timp de o oră, fapt ce a permis desprinderea, cu ușurință, a pericarpului și cântărirea fiecărei fracții la balanța de torsion. Datele obținute au fost prelucrate statistic în programul Statgraphics Centurion XV.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Gena *opaque-2* este o genă recesivă, care determină structura făinoasă a endospermului. Ea este situată în cromozomul 7 în locusul 16 în apropiere de centromer și la formele diploide se moștenește conform legilor mendeliene ale eredității, segregând în generația a doua într-un raport clasic mendelian de 3:1 (Miku, V. 1981; Palij, A. 1989). Reieșind din modelul teoretic de moștenire a caracterelor la tetraploizi, gena se încadrează în limita segregării cromozomale, întrucât se află în apropiere de centromer. Astfel, la autopolenizarea unui duplex după gena *opaque-2* se poate obține o segregare genotipică 1:8:18:8:1 și una fenotipică de 35:1, prezentată în tabelul 1.

**Tabelul 1.** Segregarea genotipică în  $F_2$  a unui tetraploid duplex  $O_2O_2o_2o_2$  în cazul unei meioze normale

Gameți feminini	Gameți masculini		
	$1O_2O_2$	$4O_2o_2$	$1o_2o_2$
$1O_2O_2$	$1O_2O_2O_2O_2$	$4O_2O_2O_2o_2$	$1O_2O_2o_2o_2$
$4O_2o_2$	$4O_2O_2O_2o_2$	$16O_2O_2o_2o_2$	$4O_2o_2o_2o_2$
$1o_2o_2$	$1O_2O_2o_2o_2$	$4O_2o_2o_2o_2$	$1o_2o_2o_2o_2$

În rezultatul analizei știuleților din generația a doua, obținuți prin autopolenizarea duplexilor  $O_2O_2o_2o_2$  și determinarea numărului de boabe din fiecare clasă, s-au obținut datele prezentate în tabelul 2.

Din rezultatele obținute se poate remarca segregarea empirică de 34,33:1, ceea ce este aproape de segregarea 35:1 teoretică. Pentru a constata dacă abaterea de la segregarea teoretică este una normală, am calculat valoarea testului  $\chi^2$ .

Aplicarea acestui test pornește de la ipoteza nulă conform căreia se așteaptă ca diferența între rezultatele observate experimental și cele teoretice să fie egală cu zero. În genetică, ipoteza nulă poate fi respinsă doar când abaterile valorilor experimentale față de cele teoretice apar cu o probabilitate de 5% sau mai mică ( $Pd \leq 0,05$ ). Când valoarea  $\chi^2$  calculată depășește valoarea teoretică a acestuia, ce corespunde unui nivel de semnificație (P) de 5%, se consideră că datele observate se deosebesc semnificativ de cele calculate teoretic, iar ipoteza nulă se respinge. Rezultatele aplicării testului  $\chi^2$  privind monohibridarea după gena *opaque-2* la tetraploizii porumbului sunt prezentate în tabelul 3.

După prelucrarea datelor s-a obținut valoarea lui  $\chi^2=0,055$ . Căutând în tabelul lui R. A. Fisher valoarea calculată a testului în dreptul gradelor de libertate 1, observăm că aceasta se află între valorile 0,016 și 0,064, ceea ce corespunde unei probabilități  $P=0,90$  și  $P=0,80$ . Reieșind din faptul că valoarea calculată a testului este mai mică decât cea teoretică de 3,84, ipoteza nulă rămâne valabilă. Prin urmare, gena *opaque-2* se transmite la tetraploizii porumbului după modelul segregării cromozomale aleatorie.

**Tabelul 2.** Analiza descendenței  $F_2$  de la autopolenizarea tetraploidului duplex heterozigot  $U3-2 \times Sin.B$  după gena *opaque-2*

Nr. știuletelui	Numărul boabelor conform claselor fenotipice		
	sticloase	făinoase	Total
1	366	9	375
2	300	7	307
3	534	19	553
4	431	12	443
5	524	12	536
6	346	9	355
7	289	8	297
8	180	6	186
9	260	9	269
10	373	11	384
11	373	7	380
12	240	10	250
13	325	9	334
14	290	12	302
15	270	7	277
16	363	10	373
17	291	10	301
18	150	5	155
Suma (?)	5905	172	6077
Segregarea empirică	<b>34,33 : 1</b>		

**Tabelul 3.** Calculul testului  $\chi^2$  în monohibridarea formelor tetraploide de porumb *opaque-2*

Specificare	Boabe	
	sticloase	făinoase
Numărul de boabe:		
- empirice	5905	172
- teoretice (q) (35:1)	5908	169
Abaterea (d)	-3	3
$d^2$	9	9
$d^2/q$	0,002	0,053
$\chi^2 = \Sigma(d^2/q)$	<b>0,055</b>	
$\chi^2_{0.05}$	3,84	

Rezultatele obținute de noi confirmă și datele din literatură cu privire la ereditatea caracterelor la tetraploizii porumbului. Segregarea la porumbul tetraploid, aproape de 35:1, a fost pentru prima dată menționată în investigațiile efectuate de către L.F. Randolph (1935). Unii cercetători au constatat că segregarea după culoare a boabelor la tetraploizii porumbului în generația a doua a fost de 28:1 (Šumnyj, V.K. 1965). Alți cercetători, însă, au obținut un raport de 34:1, după culoarea boabelor, și de 33:1 – după consistență (Hadžinov, M.I., Serbak, V.S. 1974). Diferențele în rezultate sunt explicate prin particularitățile fiecărei gene (poziția față de centromer) și comportamentul cromozomilor în meioză. Acest fapt a fost relevat în urma studiului mecanismului eredității unor caractere la porumbul tetraploid în care s-a constatat că raportul claselor fenotipice în  $F_2$  de la duplecși este strict individual pentru fiecare pereche de gene și depinde de amplasarea lor în grupele de linkage, în deosebi, de distanța dintre gene și centromer (Welch, J.E. 1962; Serbak, V.S. 1971).

Obținerea boabelor segregante pe știuleții tetraploizi a permis studierea și a altor indici importanți legați de acțiunea genei *opaque-2*.

Se cunoaște că incorporarea genei *opaque-2* în genotip determină sporirea cotei embrionului și, respectiv, reducerea cotei endospermului (Palij, A. 1989). Ținând cont de acest fapt, unul din obiectivele

cercetării noastre a fost de a releva influența posibilă a acestei mutații asupra structurii anatomice a bobului la porumbul tetraploid (Tabelul 4).

**Tabelul 4.** Structura anatomică a boabelor normale și mutante obținute în F2 la porumbul tetraploid heterozigot după gena *o2*

Frația anatomică	Fenotipul endospermului	Indici statistici			Cota medie, %	P
		M±m*, mg	S	V, %		
Bobul întreg	normal	270,39±9,56	26,07	9,64	100,00	0,18
	mutant	261,50±9,48	25,38	9,70	100,00	
Endosperm	normal	216,94±8,51	23,20	10,70	80,23	0,07
	mutant	206,33±8,45	22,64	10,97	78,90	
Embrion	normal	31,03±1,30	3,54	11,42	11,48	0,11
	mutant	32,53±1,44	3,85	11,83	12,44	
Pericarp +vârf	normal	22,42±0,63	1,71	7,62	8,29	0,68
	mutant	22,63±0,87	2,34	10,34	8,66	

\*m – intervalul de confidență de 95%

Din rezultatele obținute se observă, în primul rând, că masa medie a unui bob tetraploid ce conține gena mutantă *opaque-2*, are tendința de a fi mai mică decât cea a bobului normal, fapt ce poate fi explicat prin consistența poroasă a endospermului la boabele mutante. Masa embrionului este, însă, mai mare la boabele mutante. Se remarcă, de asemenea, și o tendință a boabelor mutante de a avea o cotă mai mare a embrionului, iar a endospermului – mai mică față de boabele normale. Totuși, în urma analizei diferenței statistice dintre fiecare fracție în parte a boabelor normale și mutante, s-a stabilit că această diferență nu este semnificativă ( $P > 0,05$ ). Astfel, datele obținute susțin faptul că gena *opaque-2* sporește cota embrionului și reduce pe cea a endospermului, această diferență fiind însă nesemnificativă.

## CONCLUZII

În rezultatul analizei hibridologice a manifestării fenotipice a mutației *opaque-2* la formele de porumb tetraploid s-a constatat că aceasta se transmite după modelul segregării cromozomale întâmplătoare, într-un raport fenotipic de 35:1, fapt confirmat prin aplicarea testului  $\chi^2$ , care a generat o valoare de 0,055. Analiza fracțiilor anatomice a boabelor normale și *opaque-2* a relevat faptul că cota embrionului și a endospermului sub influența genei *o<sub>2</sub>*, practic, nu se schimbă.

## REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- HADŽINOV, M.I., SERBAK, V.S., 1974. Poliploidia u kukuruzy. In: Teoretičeskie i praktičeskie problemy poliploidii. Moskva: Nauka. s. 27-42.
- MIKU, V.E., 1981. Genetičeskie issledovaniâ kukuruzy. Kišinev: Știința. 231 s.
- PALII, A.F., 1989. Genetičeskie aspekty ulučšeniâ kačestva zerna kukuruzy. Kišinev: Știința, 175 s.
- PALII, A., 1998. Genetica. Chișinău: Museum. 352 p.
- PALII, A., BATÎRU, G., 2011. Obținerea experimentală a formelor tetraploide de porumb *opaque-2*. In: Ameliorarea porumbului și utilizarea androsterilității citoplasmatică în producerea de semințe: materialele conf. intern., Chișinău, pp. 88-97.
- RANDOLPH, L.F., 1935. Cytogenetics of tetraploid maize. *Journal of Agricultural Research*, vol. 50. pp. 591-605.
- SAVČENKO, V.K., 1976. Genetika poliploidnyh populacij. Minsk: Nauka i Tehnika. 240 s.
- SERBAK, V.S., 1971. Mendelevscoe rasjelenie u avtotetraploidnoj kukuruzy. *Genetika*, t. 7, a 7, s. 29-35;
- ŠUMNYJ, V.K., 1965. Izučenie tetraploidov kukuruzy. V: Poliploidia i selekciâ. Moskva-Leningrad: Nauka, s. 303-307.
- TATE, J.A., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., 2005. Polyploidy in plants. In: The evolution of the genome, T.R. Gregory (ed.), San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 371-426.
- WELCH, J.E., 1962. Linkage in autotetraploid maize. *Genetics*, vol. 47, pp. 367-396.

Data prezentării articolului: **18.01.2013**

Data acceptării articolului: **10.03.2013**