

## **INCLUDEREA TEHNOLOGIEI DH ÎNTR-UN PROTOCOL DE MUTAGENEZĂ LA GRÂU – REZULTATE PRELIMINARE\***

### **PRELIMINARY RESULTS ON DH TECHNOLOGY INCLUSION IN A WHEAT MUTAGENIC PROTOCOL**

AUREL GIURA<sup>1</sup>

#### **Abstract**

The paper presents preliminary results on attempt to enhance genetic variability and create novel one by both mutagenic and recombination events using a specific protocol in which DH (doubled haploids) technology was included. The starting material was represented by two modern Romanian wheat genotypes: cultivar Izvor released in 2009 and advanced breeding line F00628G-34, each having very valuable but contrasting agronomic traits. Mutagenic treatments with gamma rays consisting of two irradiation cycles were performed by IAEA-Vienna. For the first cycle, seed of each genotype (50 g.) was treated with 200 gamma rays (Gy). In second cycle, the treatments were done on the hybrid seeds resulted from direct (100Gy) and reciprocal (200Gy) crosses of M<sub>1</sub> plants derived from the first cycle.

Plants of the four M<sub>1</sub> groups together with parental ones were then crossed by maize under greenhouse conditions and values of four parameters: caryopses like structure/spike; embryos/spike; haploid plants/cultivated embryos and embryos/dissected caryopses were estimated. The analysed parameters values of irradiated materials were not much reduced as compared to values registered for non irradiated two genotypes. Even the most reduced mean values namely 13.9 caryopses like structure/spike and more than three embryos per spike noticed for reciprocal hybrids after 2<sup>nd</sup> cycle provided certainty for a subsequent development of at least 1-2 DH-line per spike.

So far a number of 138 mutated DH-lines from parental genotypes and a mapping population of 358 mutated/recombinant DH-lines derived after second irradiation cycle have been produced. It was also proved that inclusion of DH technology in a mutagenic protocol using *Zea* system may represent a valuable alternative to classical mutagenesis for recovering completely homozygous mutated genotypes in a faster way and to improve and accelerate selection procedures.

A preliminary field phenotypic evaluation of 338 mutated/recombinant completely homozygous DH-lines revealed multiple modifications at several traits of agronomic importance such as plant height, ear emergence, ears colour at maturity, leaf width, leaf length, leaf flag position, wax leaf/stem presence and resistance to some foliar diseases etc.

Further field evaluations under different environments are needed.

---

\*) Rezultate obținute în cadrul Proiectului de Cooperare Regională RER 5/0/13 (Coordonare IAEA Vienna).

<sup>1</sup> Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea, județul Călărași.  
E-mail: agiura@ricic.ro

**Key words:** Mutagenic protocol, *Zea* system, DH-technology, mutated and recombinant/ mutated homozygous genotypes.

**Cuvinte cheie:** protocol de mutageneză, sistemul *Zea*, tehnologia DH, genotipuri homozygote-mutante și mutante/recombinante.

## INTRODUCERE

Principiul evoluției materiei vii prin mutații spontane - urmate de reorganizări ale materialului genetic și biostructurilor este astăzi deplin argumentat în științele evoluționiste moderne.

La plante, mutațiile la nivel de genom, de cromozomi și/sau de gene au avut rol determinant în procesul formării speciilor și al adaptării acestora la variatele areale și condiții de mediu. În cazul plantelor de cultură însă direcția evoluției a fost, în milenii din urmă, dirijată de om în propriul interes prin promovarea de mutante care-i puteau asigura necesitățile de trai.

După descoperirea efectului mutagen al razelor X la începutul secolului XX și, ulterior, al altor factori mutageni fizici și chimici, genofondul natural de variabilitate potențial utilă al speciilor cultivate a fost întregit cu o variabilitate indusă artificial. Cum aceasta din urmă nu diferă esențial față de cea naturală - exceptând modul rapid de producere - includerea ei în programe de selecție a făcut posibilă recuperarea de forme mutante valoroase într-o perioadă relativ scurtă de timp. Multe din aceste forme mutante au fost și sunt utilizate direct în cultură ca noi soiuri iar altele s-au dovedit a fi surse importante de gene în diferite programe de ameliorare. Sunt cunoscute astăzi pe plan internațional peste 2700 soiuri obținute prin mutageneză la cca 170 specii cultivate (L a g o d a , 2008).

La I.N.C.D.A. Fundulea cercetări de mutageneză au fost inițiate încă de la înființarea institutului în 1962 în scopul diversificării variabilității genetice pentru o serie de însușiri de importanță agronomică. S-au folosit mai mulți agenți mutageni fizici și chimici în diferite doze și concentrații cu timpi de expunere variați. Primele lucrări au urmărit în special evaluarea modificărilor fenotipice induse sub acțiunea factorilor mutageni atât în  $M_1$ , cât și în generațiile ulterioare. Totodată, au fost analizate efectele diferitelor tratamente cu agenți mutageni asupra desfășurării mitozei și meiozei și s-au obținut date privind radiosensibilitatea unor genotipuri și specii. Prin lucrări de selecție au fost promovate numeroase forme mutante unele dintre ele fiind înregistrate ca soiuri noi. Astfel, la fasole a fost înregistrat soiul Premial în 1978 (P o p a , 1980), la mazăre soiul Dora în 1989 (T r i f u , 1987) și la orez soiurile Oltenița și Magic înregistrate în 1991 și, respectiv, în 2005 (A l i o n t e și A l i o n t e , 1995; A l i o n t e și colab., 2005).

La alte specii de cultură interesul pentru mutageneză ca mijloc de ameliorare a fost treptat redus sau abandonat întrucât prin schimburi internaționale de material biologic s-au putut procura după anul 1965, cu relativă ușurință, sursele de variabilitate dorite. În consecință, multe din liniile mutante care nu s-au evidențiat în testele de câmp au fost eliminate. De asemenea, inexistența

mijloacelor de analiză genetică la nivel molecular din perioada respectivă a fost o frână la promovarea ameliorării prin mutagenză atât la noi, cât și pe plan internațional (G i u r a , 2008).

Deși cultivarele mutante înregistrate până în prezent sunt mai puțin numeroase față de cele obținute prin ameliorarea clasică, interesul pentru mutagenză se bucură astăzi de o reînăscută atenție, date fiind posibilitățile oferite de progresul cercetărilor de genomică pentru identificarea de noi gene-alele produse sub acțiunea factorilor mutageni. De aici și oportunitățile care decurg pentru utilizarea liniilor mutante atât în ameliorarea practică asistată eventual de markeri moleculari, cât și în cercetări moderne de genetică moleculară cu identificarea de noi alele per locus și lucrări de secvențiere și de analiză la nivel funcțional.

Lucrarea prezintă rezultate preliminare obținute în urma folosirii unui protocol special de mutagenză în care s-a introdus tehnologia DH (sistemul biotehnologic *Zea*) în scopul obținerii concomitente de variante alelice mutante și/sau recombinante complet homozigote, într-o singură generație. Întrucât majoritatea mutantelor obținute la plante în urma tratamentelor cu radiații ionizante sunt de natură recesivă, aplicarea tehnologiei DH face posibilă recuperarea și selecția imediată a celor valoroase pe baza expresiei directe în fenotip a alelei/alelelor recesive mutante. În plus, obținerea unei populații numeroase de linii dublu haploide cu genoame complet homozigote, incluzând diferitele variante alelice mutante și/sau de recombinare pentru o serie de însușiri morfologice, fiziologice etc., mărește șansele de selecție a celor mai valoroase oferind în același timp materialul de bază pentru dezvoltarea în perspectivă a unor lucrări de genomică. Sunt, de asemenea, prezentate primele date parțiale de fenotipare cu evidențierea unor modificări în morfologia plantei ori pentru alte caractere de interes agronomic.

## MATERIAL SI METODE

**Materialul biologic** supus tratamentelor mutagene a fost reprezentat de două genotipuri moderne de grâu de toamnă și de hibridii direcți și reciproci ai generației  $M_1$  obținute după iradierea acestora. Soiul Izvor și linia F00628G-34 sunt genotipuri de talie redusă (semi-dwarf), însușire controlată de gena *RhtB1*. Ele sunt grâne reprezentative pentru genofondul ameliorat recent la I.N.C.D.A. Fundulea, dar se diferențiază totuși prin câteva însușiri specifice:

- soiul Izvor, înregistrat în 2009, este rezistent la secetă, poartă pe cromozomul 7A alela recesivă “*or*” care îi conferă o capacitate ridicată de osmoreglare; este rezistent la cădere și se remarcă prin producție ridicată în anii secetoși.

- linia F00628G-34 este sensibilă la secetă, este rezistentă la încolțirea boabelor în spic, are o capacitate ridicată de producție în arealele fără stres hidric, este rezistentă la cădere și cu o bună rezistență la unele boli precum

făinarea, mălura comună și *Septoria tritici*. Din păcate, gena de rezistență la rugina brună nu mai este eficientă în prezent.

Linia are în genom translocația 1AL/1RS, brațul de seară purtând printre altele și genele de rezistență menționate.

Tratamentele cu factori mutageni au fost efectuate la centrul de la Seibersdorf al IAEA Viena. S-au aplicat două cicluri de iradiere cu raze gamma ( $\gamma^{60}\text{Co}$ ) în doze diferite: primul ciclu în anul 2007 prin iradierea de semințe de la soiului Izvor și de la linia F00628G-34 (câte 50 g din fiecare) și al doilea ciclu, pe semințele  $F_0$  rezultate din încrucișarea directă (1569 semințe) și reciprocă (1425 semințe) de plante din generația  $M_1$  obținută după primul ciclu (tabelul 1). S-a convenit pentru iradierea cu raze gamma deoarece majoritatea soiurilor mutante înregistrate în baza de date (IAEA Mutant Variety Database) au fost obținute în urma folosirii acestei surse de radiații ionizante.

Tabelul 1

**Genotipurile de grâu și dozele de iradiere aplicate**  
(Wheat genotypes and irradiation doses)

Genotipurul	Ciclul de iradiere	Țesutul	Doza aplicată
Izvor	I	semințe	200 Gy
F00628G-34	I	semințe	200 Gy
A. $M_1$ -Izvor x $M_1$ -F00628G-34	II	semințe $F_0$	100 Gy
B. $M_1$ -F00628G-34 x $M_1$ -Izvor	II	semințe $F_0$	200 Gy

Schema de lucru folosită pentru generarea concomitentă de stocuri genetice mutante și/sau de recombinare la grâu este prezentată în figura 1. Semințele de la cei doi genitori, iradiate în primul ciclu, au fost semănate în condiții de câmp în anul 2007 iar plantele din generația  $M_1$  au fost autopolenizate și/sau încrucișate direct și reciproc în anul 2008. Semințele hibride ( $F_0$ ) au fost din nou iradiate însă cu doze diferite, respectiv 100 și 200 Gy.

Semințe iradiate, din ambele cicluri, au fost germinate în laborator alături de semințele neiradiate ale formelor parentale. Plantele obținute au parcurs stadiul de vernalizare în condiții artificiale iar ulterior s-au cultivat în condiții de seră, începând cu luna ianuarie 2009. Tot în condiții de seră au fost cultivate direct în sol și în vase de vegetație genotipurile de porumb folosite în calitate de partener la polenizarea grâului.

Etapele ulterioare, respectiv lucrările de hibridare grâu x porumb, tratamentele *in vivo* cu fitohormoni, cultura *in vitro* a embrionilor haploizi imaturi, regenerarea haploizilor etc., s-au desfășurat conform protocolului folosit în mod curent pentru producerea de linii DH la grâu (Giura, 1993; 1998).

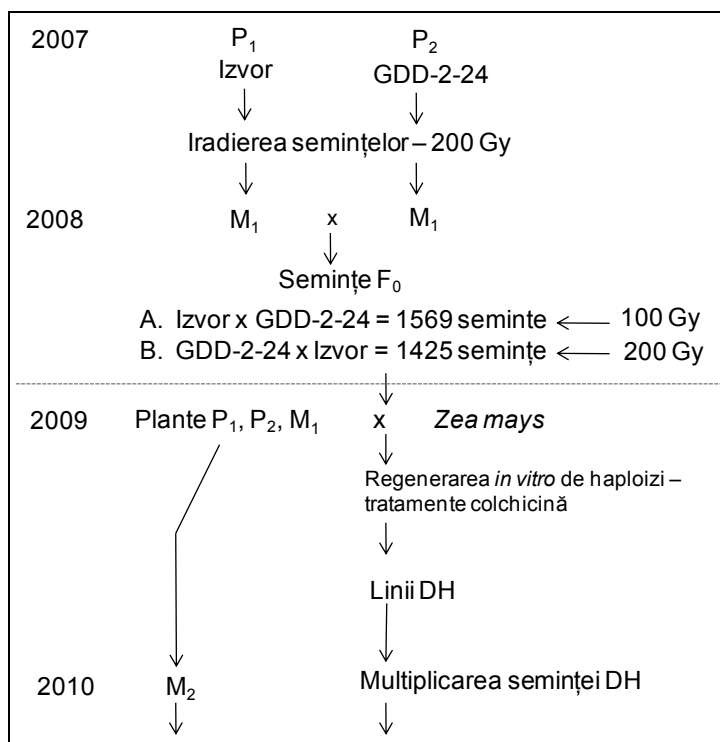


Fig. 1 - Generarea de stocuri genetice - mutante de grâu  
(Development of mutated genetic stocks in wheat)

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### A. Obținerea stocurilor genetice

Ca rezultat al lucrărilor de hibridare grâu x porumb și de disecție a cariopselor formate, au fost transferați pe un mediu artificial de cultură 2871 embrioni haploizi imaturi. S-au regenerat 1384 plante haploide din care: 1067 au provenit din materialul supus la două cicluri de iradiere, respectiv din hibridii F<sub>1</sub> direcți și reciproci; 239 din materialul care a parcurs un singur ciclu și, respectiv, 78 haploizi derivați din formele parentale neiradiate. Pentru stabilirea pretabilității sistemului *Zea* în lucrări de mutagenză s-au luat în considerare valorile unor parametri folosiți, de regulă, în analiza eficienței producerii de haploizi prin hibridări de tipul grâu x porumb, și anume: numărul de cariopse/spic polenizat cu polen de porumb (SD/Sp); numărul de embrioni haploizi/spic (E/Sp) precum și valorile procentuale pentru plante haploide/embrioni cultivați (H/EC) și pentru embrioni/cariopse disecate (E/SD) (Suenaga și Nakajima, 1989; Giura și Mihăilescu, 2000).

Se aștepta ca valorile parametrilor menționați la cele două genotipuri nesupuse tratamentelor mutagene să fie superioare celor înregistrate la materialele derivate după primul și, respectiv, după al doilea ciclu de iradiere. Această presupunere a fost confirmată numai în cazul soiului Izvor și doar pentru doi parametri: SD/S și H/EC. În schimb, valorile E/Sp și E/SD au fost superioare după primul ciclu de iradiere, fapt care presupune că iradierea cu raze gamma poate avea și efect stimulator în anumite situații. După al doilea ciclu de iradiere valorile parametrilor au fost însă semnificativ mai mici atât la hibridii  $F_1$  direcți, cât și la hibridii  $F_1$  reciproci. La aceștia din urmă doza de iradiere în al doilea ciclu a fost dublă, respectiv 200 Gy, față de doza aplicată hibridilor direcți, de numai 100 Gy. Cu toate acestea, cele mai mici valori înregistrate la hibridii reciproci (F00628G-34/Izvor), și anume, un număr mediu de 13 cariopse/spic și de 3,4 embrioni haploizi/spic transferați pentru cultura *in vitro*, au fost neașteptat de bune pentru materiale biologice care au suferit două cicluri succesive de iradiere cu un total de 400 Gy (figura 2).

Plante normale = Mt

$M_1$  după 1-ul ciclu: A și B

$M_1$  după al 2-lea ciclu: AxB și BxA

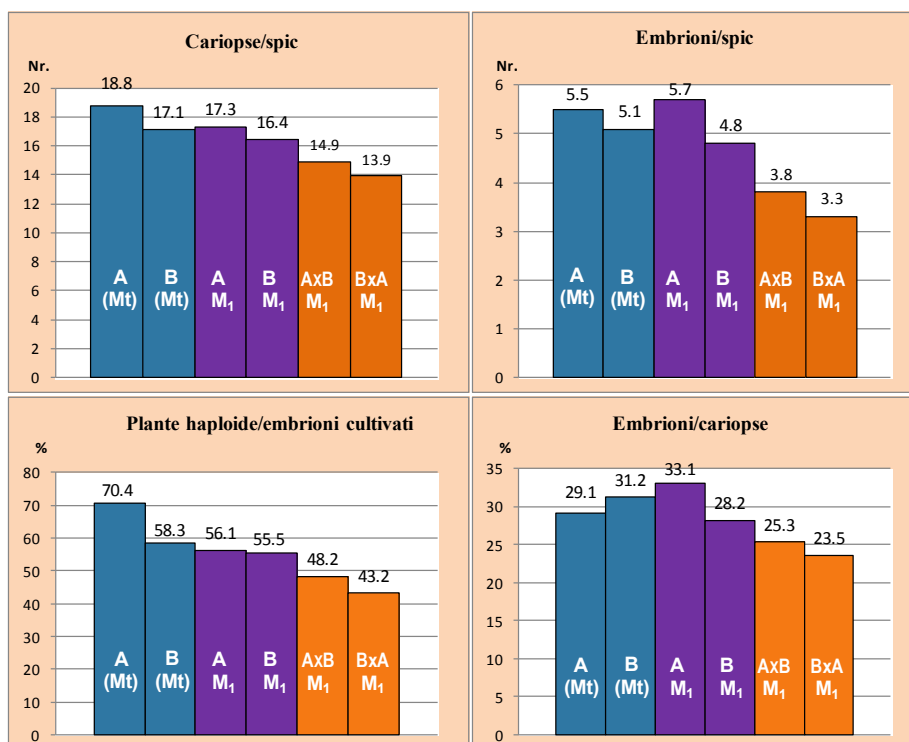


Fig. 2 - Efectul iradierii în producerea de haploizi la grâu prin sistemul Zea (Irradiation effects on wheat haploid production using Zea system)

Astfel de valori pot justifica folosirea curentă a tehnologiei DH în lucrări de mutagenză la grâu comun. Chiar dacă în urma lucrărilor din fazele ulterioare (regenerarea *in vitro* a plantelor haploide, tratamente cu colchicină etc.) se ajunge în final la producerea a numai 1-2 linii DH/spic, randamentul unui protocol de mutagenză cu includerea tehnologiei DH poate fi considerat satisfăcător. Dacă la acestea se adaugă și avantajele care decurg din homozigotarea într-o singură generație a mutațiilor și/sau recombinărilor ca și posibilitatea identificărilor imediate a însușirilor fenotipice modificate (morfologice, fiziologice etc.), reies în mod evident beneficiile abordărilor prezentate în lucrare.

În urma lucrărilor întreprinse în anul 2009 au fost obținute următoarele stocuri genetice:

- 81 linii DH-mutante din soiul Izvor (din ciclul I de iradiere);
- 57 linii DH-mutante din linia F00628G-34 (din ciclul I de iradiere);
- 358 linii DH-mutante și/sau de recombinare din hibridii reciproci ai plantelor  $M_1$  (din ciclul II de iradiere).

Alte linii DH-mutante și/sau recombinante sunt în curs de finalizare.

De asemenea, prin folosirea mutagenzei clasice s-au obținut 710 populații de plante  $M_2$ .

## **B. Fenotipare parțială**

După o primă multiplicare a stocului de sămânță rezultat în urma colchicinizării haploizilor, parte din liniile DH-mutante obținute din soiul Izvor și din linia F00628G-34, după primul ciclu de iradiere, ca și 338 linii DH-mutante obținute după al doilea ciclu de iradiere au fost semănate în toamna anului 2010, în câmp, alături de formele parentale pe 1-2 rânduri a 25 semințe/rând, în perechi de rânduri cu spațierea de 25 cm între rânduri și 50 cm între perechi.

Observațiile efectuate în sezonul 2010-2011 au evidențiat o variabilitate pentru diferite însușiri și/sau modificări morfologice atât între linii, cât și față de formele parentale, în special la materialul care a parcurs două cicluri de iradiere. În populația de 338 linii DH analizate a fost identificată și măsurată, variabilitatea pentru o serie de însușiri, ca: talie, data înspicacului, maturitate, forma, mărimea și culoarea frunzei, poziția spicului ca și rezistența/sensibilitatea la unele boli. Înălțimea plantei a variat de la 58-60 cm la 109-110 cm, majoritatea liniilor grupându-se în clasele de 85-90 cm, având o talie mai mică cu cca 12-13 cm față de formele parentale (figura 3).

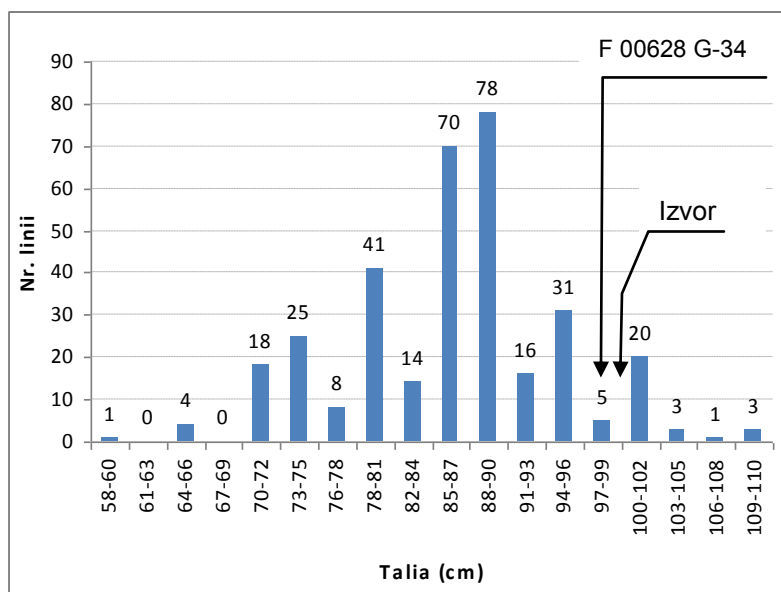


Fig. 3 - Dispersia pentru talia plantei în populația de 338 linii DH, obținută după două cicluri de iradiere  
(Dispersion for plant height in 338 DH lines population obtained after two irradiation cycles)

Variații corespunzătoare s-au observat și în cazul spicelor: spice mai lungi ori mai scurte cu graduări diferite de compactitate inclusiv mutante tip 'squarehead' și culoare diferită la maturitate. Analiza parametrilor care definesc productivitatea pe spic se află în curs de desfășurare.

O mare variație a fost înregistrată pentru morfologia frunzei, aceasta având diferite lungimi ori lățimi, cu poziționarea erectă, semierectă sau aplecată a frunzei steag. La unele linii cu frunze de lungimi maxime de 33,5 cm lățimea acestora nu a depășit 1,2 cm, pe când la alte linii cu frunze scurte de cca 18 cm, lățimea a fost de cca 2 cm. La fel, multe linii au prezentat frunze cu diferite nuanțe de verde - de la verde deschis la verde închis - ori cu prezența/absența unui strat ceros mai intens sau mai puțin intens față de părintele Izvor. Prezența stratului ceros pe frunze a fost acompaniată de cerozitatea tulpinii, evidentă pe toată lungimea paiului sau numai pe gâtul spicului. Au fost identificate și linii cu pete mici clorotice dar nu s-au observat linii DH cu deficiențe clorofilene majore ca mutante de tipul 'xanta' ori 'albino' ce se întâlnesc în mutagenеза clasică. Probabil că astfel de tipuri mutante sunt incompatibile cu starea de haploidie sau nu pot fi regenerate în urma culturii embrionilor haploizi pe medii artificiale.

Perioada de vegetație a liniilor DH s-a corelat, în general, cu înspicatul. Au fost însă și excepții la care perioada înspicat - maturitate a fost mai scurtă ori mai lungă.

Referitor la înspicat, acesta s-a desfășurat într-un interval de 12 zile (12-24 mai). Marea majoritate a liniilor au înspicat simultan cu părinții: 132 linii au



înspicat în același timp cu soiul Izvor și 100 linii odată cu linia F00628G-34. Alte 65 de linii au înspicat mai devreme decât părinții iar 41 linii au înspicat mai târziu (figura 4).

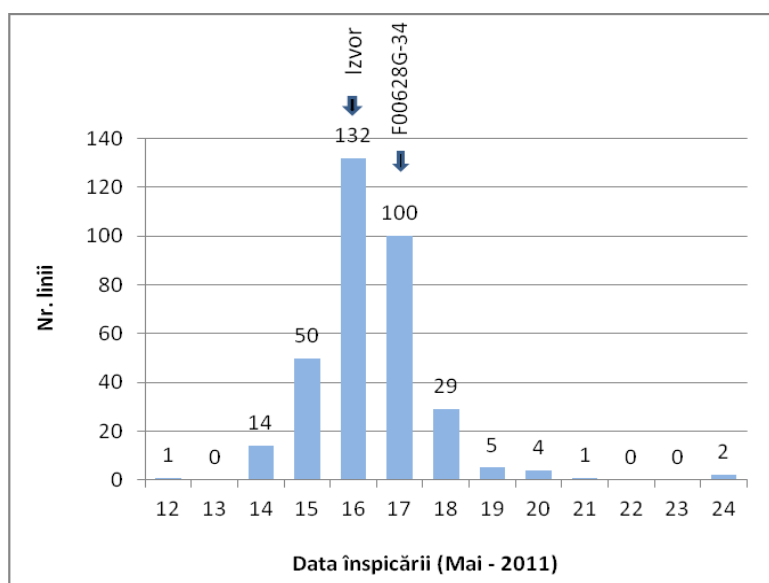


Fig. 4 - Dispersia pentru data înspicatului în populația de 338 linii DH obținută după două cicluri de iradiere  
(Dispersion for ear emergence in 338 DH lines population obtained after two irradiation cycles)

Cât privește însușirea de rezistență/sensibilitate la unele boli foliare, evoluția stării de epifiție naturală din anul 2011 - cu pierderea rezistenței totale a formelor parentale la rugina brună - a făcut posibilă evidențierea unor mutante rezistente ca și a altora, mult mai sensibile comparativ cu formele parentale.

Este de așteptat ca unele din însușirile fiziologice, menționate în prezentarea genotipurilor parentale, ca și alte caractere mutate sau rezultate prin recombinare să poată fi alocate fiecăreia din cele 338 linii DH ale populației studiate pe baza analizelor în curs de desfășurare cu markeri moleculari. Datele preliminare de fenotipare prezentate urmează a fi întregite în sezonul 2011-2012 prin analize extinse la toată populația de 358 linii DH.

## CONCLUZII

- Valorile relativ ridicate obținute la parametrii care caracterizează eficiența producerii de haploizi, în special, la hibridii care au parcurs două cicluri succesive de iradiere cumulând 400 Gy, arată că includerea sistemului biotehologic *Zea* în lucrări de mutagenză este o cale sigură și în același timp

extrem de utilă pentru homozigotarea materialului supus tratamentelor mutagene.

- Folosirea tehnologiei DH în protocolul nostru de mutagenză a făcut posibilă obținerea de stocuri genetice valoroase de linii complet homozigote într-un interval de timp redus.

- Populația de 358 linii DH-mutante și/sau de recombinare alături de alte linii în curs de finalizare se constituie ca genofond valoros pentru analize de fenotipare-genotipare și de identificare de noi variante alelice la locii de interes.

- Analizele fenotipice preliminare privind variabilitatea unor însușiri de interes agronomic precum și manifestarea acestora în stare de homozigoție completă au scos în evidență o variabilitate indusă extinsă. În scopul valorificării superioare a liniilor DH este necesară continuarea lucrărilor de fenotipare, incluzând și teste pentru alte însușiri și în condiții diferite de mediu.

#### REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- ALIONTE, GH., ALIONTE, ELIANA 1995 – *Results obtained in rice breeding (Oriza sativa, L.) by induced mutation method*. Romanian Agric. Res., 4: 53-62.
- ALIONTE, GH., IORGA, DANIELA, ALIONTE, ELIANA 2005 – *Magic soi nou de orez creat prin mutagenză la INCDA-Fundulea*. Analele INCDA Fundulea, LXXII: 59-66.
- GIURA, A., 1993 – *Progress in wheat haploid production*. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp., Beijing, China: 741-745.
- GIURA, A., 1998 – *Wheat haploid production efficiency in wheat-maize crosses*. In: Curent Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement. (Ed. T. Lelley) IFA, Tulln, Austria: 303-309.
- GIURA, A., 2008 – *Overview on applied mutagenesis at National Agricultural Research and Development Institute-Fundulea* (14 pp). In: Romanian Nuclear Agency Report 52<sup>nd</sup> IAEA General Conference, Vienna, 29 September- 4 October, 2008. ([www.incda-fundulea.ro](http://www.incda-fundulea.ro)).
- GIURA, A., MIHĂILESCU, ALEXNDRINA, 2000 – *Metode moderne de reducere a duratei programelor de ameliorare la grâu și orz*. În: Metode de Cercetare în Cultura Plantelor, Editura Agris, București: 17-36.
- LAGODA, P.J. L., 2008 – *Networking and fostering of cooperation in plant mutation genetics and breeding: role of the joint FAO/IAEA programme*. International Symposium on Induced Mutations in Plants (12-15 August, 2008, Vienna), Austria, (Abstract): 2.
- POPA, GH., 1980 – *Soiul de fasole "Premial"*. In: Cercetarea în sprijinul producției – Cultura plantelor de câmp. Redacția de Propagandă Tehnică Agricolă, București).
- SUENAGA, K., NAKAJIMA, K., 1989 – *Efficient production of haploid wheat (Triticum aestivum) through crosses between Japanese wheat and maize (Zea mays)*. Plant Cell Reports, 8: 263-266.
- TRIFU, I., 1987 – *Ereditatea rezistenței mazării la scuturare*. Probl. genet. teor aplic., XIV (2): 87-96.

Prezentată Comitetului de redacție la 1 iunie 2011