

PARTICULARITĂȚILE MANIFESTĂRII HETEROZISULUI LA DIFERITE NIVELURI DE ORGANIZAȚIE BIOLOGICĂ A GENOMULUI HIBRIZILOR SÎMPPLI DE PORUMB

***A.PALII¹, GALINA COMAROV¹, D. DOROKHOV², A. ROTARI³,
A.MIHALACHI¹, A.NEDOLUZHKO², A.TIHONOV², E. ROTARI³***

¹Universitatea Agrară de Stat din Moldova;

²Centrul de Bioinginerie al AȘ Rusia, Moscova;

³Institutul de Fitotehnie „Porumbeni”

Abstract. In the article are presented experimental evidences about the rationality of using parameters of manifestation heterosis effect manifestation at different levels of biological organization and the level of dominance for evidence – at the DNA molecules level – of the essential correlations between the particular primers of properly PCR-technologies and reproductive, somatic and adaptive parameters of heterosis.

Cuvinte cheie: Adaptive, Correlation, DNA-primer, Heterosis reproductive, Molecular, Somatic.

INTRODUCERE

Cercetările clasice a fenomenului heterozis la plante au fost inițiate în mijlocul secolului al XX-lea și în conformitate cu clasificarea lui A. Gustafson (Palii, 1998) sunt deosebite trei forme ale manifestării acestuia:

- a) heterozisul reproductiv, care favorizează sporirea fertilității și productivității plantelor;
- b) heterozisul somatic, care mărește dimensiunile liniare ale plantelor hibride și (sau) masa lor;
- c) heterozisul adaptiv, care mărește adaptabilitatea hibrizilor la acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului ambiant.

De la începutul anilor 70 ai secolului XX s-a profilat o abordare molecular-genetică în studierea fenomenului heterozis (Konarev, 1974; Ali-Zade, Aliev, 1980; Cesnokov, 2007). Grație introducerii în practica experimentală a studiilor genetice a tehnologiilor ADN-marker în prezent a apărut un volum mare de date experimentale privind identificarea moleculară a genomului principalelor culturi agricole și, în special, a porumbului, fiind un procedeu valoros, atât în plan teoretic, cât și practic, utilizat pe larg în ameliorarea la heterozis (Comarov ș.a., 1996; Barbacar ș.a., 2005; Cesnokov, 2007).

În această ordine de idei, în ultimul timp, atenția cercetătorilor cu privire la problema heterozis este atrasă de tehnologiile ADN-marker. Din punct de vedere teoretic, anume aceste tehnologii oferă posibilitatea de a lucra cu purtătorul nemijlocit al informației ereditare. Astfel, devine destul de actuală problema studierii specificului efectului heterozis la nivel molecular, urmată de compararea datelor noi cu clasificarea tradițională a lui Gustafson după trei nivele de interpretare biologică a heterozisului. Această abordare este una din cele mai potrivite pentru verificarea experimentală în perspectivă a ipotezei de lucru privind posibilitatea identificării modalităților noi în metodologia pronosticării efectului heterozis la plante.

Pentru verificarea ipotezei de lucru menționate, la baza obținerii informației sistematice experimentale despre complexul de parametri biologici cu diferit nivel de organizare biologică a genomului *Zea mays L.* pot fi folosite mai multe interpretări matematice a acestora, printre care un interes deosebit prezintă:

1) analiza cluster – pentru evidențierea conexiunilor dintre distantele genetice între liniile parentale studiate și hibridii lor;

2) analiza de corelație – permite analiza corelațională dintre efectul heterozis, manifestat la diferite niveluri de organizare biologică: reproductiv, somatic, adaptiv și molecular, cu interpretarea matematică ulterioară a interconexiunii lor.

MATERIAL ȘI METODĂ

În calitate de obiect de studiu a fost luat porumbul (*Zea mays L.*), care reprezintă modelul cel mai frecvent utilizat pentru studiul teoretic al fenomenului heterozis și pentru elaborările practice în domeniul selecției heterozisului. Pentru cercetare au fost selectați 4 hibridi simpli omologați în Republica Moldova (*Moldavski 291 MRF*, *Porumbeni 457 AMRF*, *Chișiniovschi 307 PL*, *Chișiniovschi 401 L*), 4 combinații hibride simple (*Drujba C*, *Liana M*, *Lada C*, *Muza M*) și 14 linii de porumb, care reprezintă formele parentale ale hibridilor studiați din selecția autohtonă. În lucrare au fost folosite metodele convenționale ale experimentelor de câmp (Dospheov, 1985), metodele de studiu ale regimului hidric a frunzei (Ștefîrța ș.a., 2005), tehnologiile RAPD și ISSR bazate pe PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacția de Polimerizare în Lanț) (Colombo et al., 2000; Carvalho et al., 2002). Efectul heterozisului ipotetic (Hip), real (Hr), precum și gradul de dominare (H) au fost determinate prin metoda de calcul (Conarev ș.a., 2007). Prelucrarea matematică a datelor experimentale s-a efectuat prin metodele statistice (Dospheov, 1985) și programul MS Office Excel.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La prima etapă a experimentului au fost obținute datele, care caracterizează parametrii-cheie ai heterozisului la nivelul reproductiv - recolta de boabe, somatic - înălțimea plantelor, adaptiv - indicatorii regimului hidric: capacitatea de retenție a apei (CRA) și coeficientul de stabilitate a grosimii frunzei (CSGF), precum și ai nivelului molecular – după diferite tipuri ale formelor moleculare ale ADN-ului în funcție de primerii tehnologiilor folosite (RAPD și ISSR). Cel mai mare diapazon al variabilității în eșantionul studiat de hibridi și formele lor parentale a fost constatat pentru recolta de boabe (de la 2,7 până la 57,5 q/ha) și înălțimea plantelor (de la 110 până la 260 cm). Diapazonul variabilității parametrilor regimului hidric al frunzei este mai limitat: pentru CRA amplitudinile între 24 - 35,7%, iar pentru CSGF - de la 0,65 până la 0,83. La nivel molecular s-a stabilit, că tehnologia analizei ISSR permite a releva un polimorfism mai bogat al moleculelor de ADN, decât tehnologia RAPD.

Pe baza datelor obținute prin metoda de calcul pentru fiecare nivel de organizare biologică cercetat au fost determinate valorile heterozisului ipotetic (Hip) și real (Hr), precum și gradul de dominare (H) (tab. 1, 2, 3).

Tabelul 1. Gradul de manifestare a heterozisului reproductiv, somatic și adaptiv la hibridii simpli de porumb.

Indicii de manifestare a heterozisului după:	Denumirea hibridului	Moldav -schi 291 MRf	Porumb -eni 457 AMRf	Chișini- ovschi 307 PL	Chișini- ovschi 401 L	Drujba C	Liana M	Lada C	Muza M
	Recolta boabelor, (q/ha)	Hip	254	384	54	93	370	140	216
	Hr	212	263	40	91	254	130	171	371
	H	19	11	5	124	11	33	13	13
Înălțimea plantelor, (cm)	Hip	29	62	14	30	58	10	23	33
	Hr	25	52	13	26	46	7	14	25
	H	9	10	11	11	7	3	3	5
Capacitatea de retenție a apei (CRA)	Hip	0,4	11	2	7	-5	-5	-15	3
	Hr	0,3	5	-2	5	-13	-6	-22	0,2
	H	5	2	0,5	4	-0,5	-9	-2	1
Coeficientul de sta- bilitate a grosimii frunzei (CSGF)	Hip	-4	18	-1	7	-0,4	-10	-4	-9
	Hr	-7	17	-3	-0,7	-3	-12	-6	-12
	H	-2	26	-0,7	0,9	-0,2	-7	-2	-3

Tabelul 2. Gradul de manifestare a heterozisului la hibridii de porumb simpli după numărul formelor moleculare ale ADN-ului (tehnologia RAPD).

Denumirea primerului	Parametrii de eva- luare a heterozi- sului	Denumirea hibridului							
		Moldav- schi 291 MRf	Porum- beni 457 AMRf	Chișini- ovschi 307 PL	Chișini- ovschi 401 L	Drujba C	Liana M	Lada C	Muza M
D 2	Hip	7	7	0	7	-7	6	0	0
	Hr	0	0	0	0	-13	0	0	0
	H	1	1	0	1	-1	1	0	0
D 8	Hip	43	-33	100	0	167	33	27	9
	Hr	25	-33	33	0	60	-20	-13	0
	H	3	-*	2	0	2,5	0,5	0,6	1
D 86	Hip	25	5	-	-5	7	5	25	-9
	Hr	25	0	-9	-9	0	0	25	-9
	H	-*	1	-1	-1	1	1	-*	-*
D 135	Hip	18	11	7	11	-6	0	-26	0
	Hr	11	-9	0	11	-20	0	-30	0
	H	+3	+0,5	+1	-*	-0,3	0	-5	0

La toți hibridii de porumb simpli studiați și combinațiile hibride parentale s-a observat un diapazon larg și specific de manifestare a efectului heterozis la diferite niveluri de organizare a genomului vegetal. S-a constatat un *heterozis reproductiv* pronunțat (la producția de boabe) pentru tot eșantionul studiat de hibridi simpli

după toți cei trei indicatori ai heterozisului - Hip, Hr și gradul de dominare (H) (tab.1, coloanele 2-4). A fost relevată o tendință similară în manifestarea *heterozisului vegetativ* (după înălțimea plantelor) la majoritatea hibrizilor studiați după doi indici ai heterozisului Hip și Hr (tab. 1, coloanele 5-7). S-a constatat absența *efectului heterozis adaptiv* pozitiv după parametrii fiziologici ai regimului hidric la majoritatea hibrizilor studiați (tab.1, coloanele 8-13).

Datele prezentate în tabelul 2 și 3 indică faptul, că pentru nivelul molecular este caracteristic specificul genotipic de manifestare a efectului heterozis, însă mai clar această particularitate poate fi urmărită în cazul heterozisului ipotetic. Totodată, pentru tehnologia ISSR diapazonul de variație a valorilor, care caracterizează efectul de manifestare a heterozisului Hip și Hr, este mai informativ, în comparație cu informația similară obținută cu ajutorul tehnologiei RAPD.

Tabelul 3. *Gradul de manifestare a heterozisului la hibrizii de porumb simpli după numărul formelor moleculare ale ADN-ului (tehnologia ISSR).*

Denumirea primerului	Parametrii de evaluare a heterozisului	Denumirea hibridului							
		Moldav-schi 291 MRf	Porumbeni 457 AMRf	Chiș-niovschi 307 PL	Chiș-niovschi 401 L	Drujba C	Liana M	Lada C	Muza M
D 97	Hip	21	10	30	33	13	17	11	10
	Hr	+21	-8	+15	+17	+8	0	7	0
	H	-*	0,5	2,3	1,7	3	1	3	1
D 123	Hip	26	27	12	6	17	3	17	10
	Hr	9	17	0	11	+13	-6	0	0
	H	1,7	3	1	1	5	0,3	1	1
UBC 857	Hip	33	14	13	18	8	12	114	4
	Hr	+23	+9	0	+18	-7	+8	+67	-7
	H	4	3	1	-*	0,5	3	4	0,3

Note la tabelul 2-3: -* = ∞ - lipsa dominării

Tabelul 4. *Corelațiile (puternice și medii) între manifestarea heterozisului și dominare la nivelurile reproductiv, somatic și adaptiv ale organizării biologice.*

Heterozis rezultativ		Heterozis factorial		
după indicii	la nivel	la nivel somatic	la nivel adaptiv	
			după CRA	după CSGF
Hip	reproductiv	+0,602	<0,3	<0,3
	somatic	—	+ 0,373	+ 0,659
Hr	reproductiv	+ 0,535	<0,3	<0,3
	somatic	—	<0,3	+ 0,727*
H	reproductiv	+ 0,312	<0,3	<0,3
	somatic	—	+0,738*	+ 0,467

Notă pentru tab. 4 și 5: * t reop 0,5 = 2,45

Reieșind din datele prezentate în tabelul 4, variația gradului de dominare după indicele „înălțimea plantei” pentru $r = + 0,738$ se explică la 54% prin variabilitatea gradului de dominare după parametrul „capacitatea de retenție a apei în frunze”, iar

variabilitatea efectului heterozisului real (Hr) după „înălțimea plantelor” pentru $r = +0,727$ la 53% este condiționată de variabilitatea Hr după parametrul „coeficientul stabilității grosimii frunzei”.

Rezultatele analizei efectuate au confirmat punctul de vedere, unanim acceptat, despre disonanța rezultatelor cu privire la manifestarea efectului heterozis la nivel reproductiv, somatic și adaptiv.

La etapa a doua a studiului efectuat au fost analizate corelațiile dintre valorile, care caracterizează gradul de manifestare a heterozisului ipotetic, heterozisului real și gradului de dominare după parametrii studiați la diferite niveluri de organizare biologică a genomului *Zea mays L.* Analiza corelativă a valorilor obținute la nivelul heterozisului reproductiv, somatic și adaptiv a organizării biologice (tab. 4) ne-a permis să constatăm următoarele concluzii:

- a) între nivelul adaptiv și reproductiv de manifestare a efectului heterozis, precum și după gradul de dominare – corelația lipsește ($r < 0,3$);
- b) între nivelul somatic și reproductiv de manifestare a efectului heterozis, precum și gradul de dominare - corelarea valorii medii ($0,3 < r < 0,7$);
- c) între nivelul somatic și adaptiv este evidențiată o corelație puternică și semnificativă - $r \geq 0,7$ (la nivelul valorii semnificative de 5%).

În studiile noastre această abordare a fost extinsă prin compararea informației despre efectul de manifestare a heterozisului (Hip și Hr), precum și a gradului de dominare (H) la nivelul moleculelor ADN-ului cu indicii similari (Hip, Hr, H) după nivelurile de organizare biologică (reproductiv, somatic și adaptiv) anterior analizate. În tabelul 5 în calitate de semn factorial pentru corelațiile studiate s-au folosit indicii efectului heterozis și gradului de dominare la nivelul moleculelor de ADN – după primerii corespunzători pentru fiecare dintre cele două tehnologii utilizate PCR. O asemenea abordare a interpretării datelor obținute arată, că anume după efectul de manifestare a heterozisului poate fi descoperit un număr de corelații esențiale importante între un primer concret al tehnologiei corespunzătoare PCR și o serie de indici ai altor niveluri de organizare biologică a speciei *Zea mays L.* De exemplu, este relevat că variația heterozisului Hip pentru recolta de boabe (nivelul reproductiv) în cazul când $r = - 0,772$ la 56% se explică prin variația Hip după primerul D97 (tehnologia ISSR). O corelație mai strânsă a fost descoperită (la 82% în cazul când $r = +0,905$) între variația Hr la nivel somatic (după înălțimea plantelor) și variația Hr după primerul D123 (tehnologia ISSR).

Aceste exemple unice ale corelațiilor esențiale dintre parametrii factoriali ai nivelului molecular și caracterele rezultative ale nivelurilor reproductiv și somatic indică despre posibilitatea reală de evidențiere și identificare ai primerilor specifici conform tehnologiilor corespunzătoare PCR pentru pronosticarea efectului heterozis privind recolta de boabe și masa vegetativă la porumb, prin urmare, și la alte culturi agricole.

În toate celelalte cazuri ale corelațiilor esențiale relevate s-a constatat un număr mai mare de corelații esențiale între nivelurile molecular și adaptiv:

Tabelul 5. Legăturile corelaționale puternice și medii între heterozisul factorial la nivelul ADN-ului și tipurile rezultative ale heterozisului (reproductiv, somatic și adaptiv).

Heterozis factorial la nivelul ADN		Tehnologia		RAPD				ISSR		
		Primeri		D2	D8	D86	D135	D97	D123	UBC 857
Tipuri rezultative ale heterozisului	Hip	La nivel reproductiv		<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	-0,77*	+0,33	<0,3
		La nivel somatic		<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	-0,46	+0,60	<0,3
		La nivel adaptiv	CRA	+0,48	-0,41	-0,59	+0,83*	<0,3	<0,3	-0,70*
			CSGF	+0,30	-0,32	<0,3	+0,35	<0,3	+0,48	<0,3
	Hreal	La nivel reproductiv		<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	-0,51	<0,3	<0,3
		La nivel somatic		-0,51	<0,3	<0,3	<0,3	-0,32	+0,91*	-0,33
		La nivel adaptiv	CRA	+0,39	<0,3	-0,51	+0,83*	<0,3	+0,36	-0,53
			CSGF	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	-0,32	+0,77*	<0,3
	H	La nivel reproductiv		+0,44	-0,59	-0,51	<0,3	<0,3	<0,3	+0,43
		La nivel somatic		<0,3	+0,32	-0,69	+0,66	<0,3	<0,3	<0,3
		La nivel adaptiv	CRA	<0,3	+0,36	-0,52	+0,42	<0,3	<0,3	<0,3
			CSGF	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	-0,43	+0,42	<0,3

a) la 49% variația Hip după CRA este condiționată de variabilitatea Hip a primerului UBC 857 (tehnologia ISSR);

b) la 59% variația Hr după CSGF (coeficientul de stabilitate a grosimii frunzei) se determină prin variația Hr a primerului D 123 (tehnologia ISSR);

c) la 69% variația Hip după CRA și la 69% variația Hr de asemenea după CRA se explică prin variația Hip și, respectiv, prin variația Hr a primerului D135 (tehnologia RAPD).

După gradul de dominare (H), analiza dintre nivelurile de organizare biologică a pus în evidență corelațiile de valoare medie nesemnificativă. Cu toate acestea, se observă că variația gradului de dominare după indicii factoriali ai nivelului molecular, și anume, după tehnologia RAPD, indiferent de primerul concret utilizat, determină variația gradului de dominare după coeficienții de determinare: la nivel reproductiv de la 19% până la 26%; la nivel somatic de la 10% până la 43% și la nivel adaptiv (și anume după CRA) de la 13% până la 27% (coeficienții de corelație corespunzători sunt prezentați în tab. 5).

CONCLUZII

1. Pentru toți hibridii de porumb simpli studiați s-a stabilit un diapazon larg de manifestare a efectului heterozis:

- *heterozisul reproductiv* pronunțat după Hip, Hr, precum și după gradul de dominare (H) a caracterelor studiate;
- tendința similară a expresiei *heterozisului vegetativ* Hip și Hreal;
- absența la majoritatea hibridilor studiați a *efectului heterozis adaptiv* pozitiv după parametrii fiziologici ai regimului hidric;
- specificul genotipic de manifestare a heterozisului la nivel molecular în funcție de tehnologia PCR utilizată.

2. Sunt obținute dovezi experimentale despre raționalitatea utilizării indicilor de manifestare la niveluri multilaterale ale efectului heterozis și a gradului de dominare pentru evidențierea la nivelul moleculelor de ADN a corelațiilor de valoare esențială între primerii concreți ai tehnologiilor de PCR corespunzătoare și indicii heterozisului reproductiv, somatic și adaptiv.

3. Au fost stabilite corelații esențiale dintre indicii factoriali ai nivelului molecular (heterozisul Hip după primerul D97; heterozisul Hreal după primerul D123 – tehnologia ISSR) și indicii rezultativi ai nivelului reproductiv (heterozisul Hip după recolta de cereale) și nivelului somatic (heterozisul Hreal după înălțimea plantei), care indică la posibilitatea reală a evidențierii cu standardizarea ulterioară a primerilor specifici (după tehnologia PCR respectivă) pentru a pronostica efectul heterozis după recolta de boabe și masa vegetativă la porumb și, prin urmare, și la alte culturi agricole.

BIBLIOGRAFIE

1. Barbacar N. Baca I., Grati M. ș.a. Studiul eficienței markerilor moleculari în caracterizarea unor genotipuri de porumb, tomate, grâu și soia utilizate în ameliorare. Congresul VIII al geneticienilor și amelioratorilor din Moldova. Chișinău, 2005, p. 462-468.
2. Carvalho V.P., Ruas P.M., Ruas C.F. et al. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. In: Crop Breeding and Applied Biotechnology. 2002, no. 2, p. 557-568.
3. Colombo C., Second G., Charrier A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. In: Genetics and Molecular Biology. 2000, vol. 23, p.189-199.
4. Comarov G., Dorokhov D., Suprunov T. ș.a. Folosirea complexă a metodelor markerilor proteici și a markerilor pe baza ADN-ului pentru identificarea genotipurilor de porumb. În: Lucrări Științifice UASM, vol. 2. Chișinău, 1996, p.56-59.
5. Pali A. Genetica. Chișinău: Ediția MUSEUM, 1998, 352p.
6. Ștefiriță A., Brînză L., Buceaceaia S. et al. Metode de diagnosticare a rezistenței ecologice a plantelor. Chișinău: Centrul Ed. al UASM, 2005, 78 p.
7. Comarov G., Rotari A., Pali A. ș.a. Proâvlenie efekta heterozisa u kukuruzy na urovne belkovykh markerov. În: Știința Agricolă. Chișinău, 2007, nr.2, p.11-13.
8. Ali-Zade M.A., Aliev R.T. Sposob opredeleniâ heterozisnogo efekta u gibridov pervogo pokoleniâ. A.s. 719566 (SSSR) B.I. 1980, Nr.9.
9. Dosphehov B.A. Metodika polevogo opyta. Moskva: Agropromizdat, 1985, 351 s.
10. Konarev V.G. Biohimičeskie i molekularno-genetičeskie aspekty heterozisa. V: Vestnik s-h nauki. 1974, nr.2, s. 1-10.
11. Konarev V.G. Molekulârno-biologičeskie aspekty prikladnoj botaniki, genetiki i selekții. Moskva: Kolos, 1993, 447 s.
12. Cesnokov Iu.V. Zakon gomologičeskih rândov v nasledstvennoj izmenčivosti i molekularnâ gomologiâ genov. V: Sel.-hoz. biologiâ rastenij. 2007, nr.5, s. 9-14.