

## Литература

1. Буюкли М. Лаванда и её культура. Картя Молдовеняска. Кишинёв. 1969. с. 27-56.
2. Goncariuc M. Genotipuri noi de levănțică (*Lavandula angustifolia* Mill). Probleme actuale ale Geneticii, biotehnologiei și ameliorării. Chișinău. 2005. p. 258-262.
3. Goncariuc M. Plante Medicinale și Aromatice Cultivate. Chișinău 2008.p, 99-119.
4. Карасавиду А. О. Некоторые виды эфиромасличного сырья в медицинской практике.//Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация. 2005.№1.с.205-211
5. Paun E. Lavanda. Sănătatea Carpaților. București. 1995.p.129 - 133.
6. Ламарин М, Куркин В, Мизина П. Важнейшие компоненты *Lavandula spica*. /Химия природа соединений. Тез, док.. 7-ой Межд. Симп.2007. Ташкент.2007. с.78
7. Goncariuc M, Balmuş Z, Butnaraş V, Maşcovţeva S. Quantitative characters, content and chemical composition of the essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. F<sub>1</sub> polycross hybrids./ Book of abstracts 4th Symposium Ethno pharmacology interface between bio foods and phytomedicines. România.2011. p.19.
8. Попова С.А., Конотон А.И., Митумелу Е.Д. Кишиневская-32 -новый сорт лаванды. Исследования по селекции, семеноводству и технологии возделывания эфирносов. Кишинев, 1988. С.15-18.
9. Машковцева С. 1991. Новые сорта лаванды. Новое в эфиромасличной отрасли Молдовы. Кишинев. с.42-43.

## EVALUAREA EFECTULUI BIOCHIMIC AL MUTAȚIEI OPAQUE-2 ÎN GENOMUL PORUMBULUI TETRAPLOID

Palii A., Batîru Gr., Rotari A. \*, Rotari E. \*, Comarov Galina

Universitatea Agrară de Stat din Moldova

\*Institutul de Fitotehnie "Porumbeni"

### Rezumat

Se prezintă rezultatele studiului calității boabelor unor forme tetraploide de porumb ce conțin gena recesivă endospermală *opaque-2*, obținute pentru prima dată în Republica Moldova. Cu sporirea nivelului de ploidie conținutul de proteine în bob a crescut, iar conținutul de lipide a scăzut. Se analizează, de asemenea și influența dozei genei *opaque-2* asupra conținutul de lizină în proteină.

Cuvinte- cheie: : porumb – tetraploid – genă - *opaque-2* - proteină - lizină

Depus la redacție 12 martie 2012

-----  
Adresa pentru corespondență: Batîru Grigore, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, str. Mircești, 44, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova, e-mail: [grigore.batiru@mail.ru](mailto:grigore.batiru@mail.ru), tel. (+373 22) 432-368

### Introducere

Grație perfecționării tehnologiilor și elaborării metodelor contemporane de cartare genomică a fost depistat faptul că majoritatea culturilor agricole, inclusiv porumbul, sunt poliploizi străvechi (paleopoliploizi), ceea ce a condus la reconsiderarea importanței pe care îl are fenomenul de poliploidie în evoluție și la intensificarea cercetărilor în această direcție [9].

Porumbul (*Zea mays* L.) s-a răspândit în cultură în formă diploidă ( $2n=20$ ). Primele forme tetraploide ( $2n=40$ ) au fost obținute experimental în SUA, în anul 1932 de către L. F. Randolph [12]. La etapa inițială a cercetărilor, s-a constatat că pentru porumbul tetraploid sunt caracteristice unele particularități morfologice, fiziologice și biochimice valoroase [5, 13, 22]. O bună parte din aceste avantaje se utilizează cu succes, atât în investigațiile teoretice, cât și în practica ameliorării porumbului. Cercetările efectuate în ultimul timp au contribuit semnificativ la obținerea și utilizarea în practică a unor forme tetraploide de porumb ce depășesc formele diploide după o serie de caractere valoroase [24].

În lucrarea prezentată se analizează rezultatele cercetărilor ce țin de particularitățile biochimice ale unor forme tetraploide de porumb cu conținut majorat de lizină în bob *opaque-2* ( $o_2$ ), în vederea utilizării lor în programele de genetică și ameliorare a calității bobului.

### Materiale și metode

În calitate de material inițial a fost luat hibridul simplu de porumb cu conținutul majorat de proteină și lizină Chișiniovschi 307PL, cu endospermul  $o_2$ , omologat în Republica Moldova și populația tetraploidă sintetică B (creată de D. E. Alexander, SUA), amabil oferită de către doctorul în științe agricole È. B. Hatefov (Institutul de Cercetări Științifice în domeniul Agriculturii din Republica Kabardino-Balkaria al Academiei de Științe Agricole din Federația Rusă).

Cercetările experimentale au fost efectuate în cadrul catedrei de Ameliorare, genetică și biotehnologie a culturilor agricole a Universității Agrare de Stat din Moldova și în laboratorul de biochimie și fiziologie al Institutului de Fitotehnie "Porumbeni".

Aplicarea colchicinei în concentrație de 0,15% prin injectarea plantelor în zona meristemei apicale a acestui hibrid, în faza de 3-4 frunze și selectarea, după unele particularități morfologice ale organelor vegetative și generative, însoțită de controlul citologic al numărului de cromozomi au permis evidențierea și obținerea unor forme de porumb tetraploid  $o_2$  [11]. Formele selectate au fost reproduse prin autopolenizare.

Analizele biochimice ale mostrelor obținute au fost efectuate cu ajutorul unui dispozitiv cu unde infraroșii (modelul IR 4500, SUA), care funcționează în zona apropiată a spectrului, de asemenea și cu metode biochimice clasice [15, 18].

### Rezultate și discuții

În anul 2008, la catedra de Ameliorare, genetică și biotehnologie a culturilor agricole (în prezent catedra de Biologie vegetală) din cadrul Universității Agrare de Stat din Moldova a fost inițiat un program de cercetare având drept scop crearea unor forme tetraploide de porumb în vederea studiului manifestării genei recesive endospermale  $o_2$  în genomul tetraploid. În figura 1 prezentăm una din formele tetraploide de porumb  $o_2$ , derivate din hibridul diploid Chișiniovschi 307PL.

În studiul particularităților morfologice, biologice și biochimice ale formelor tetraploide  $o_2$  în calitate de martori au servit: hibridul diploid Chișiniovschi 307PL cu endospermul  $o_2$ , hibridul diploid Porumbeni 331 MRf (cu endospermul sticlos) și sinteticul B tetraploid (cu endospermul sticlos).



Figura 1. Știuleți de porumb diploid ( $2n=20$ ) (Chișiniovshi 307 PL) și tetraploid ( $2n=40$ ) (P38-5).

Analizele biochimice efectuate asupra materialului luat în studiu au scos în evidență unele deosebiri esențiale dintre formele diploide și tetraploide (tab.1). Astfel, ridicarea nivelului de ploidie, indiferent de prezența sau absența genei  $o_2$  în genotip, contribuie la sporirea conținutului de proteină în bob. Conținutul de proteină în bob la formele tetraploide  $o_2$  a fost în medie cu 17% mai mare față de forma diploidă mutantă Chișiniovski 307 PL și cu 30% mai mare decât la hibridul diploid Porumbeni 331 MRf cu endospermul obișnuit, iar față de sinteticul B tetraploid, nu s-au constatat diferențe.

Rezultatele obținute confirmă datele din literatura de specialitate în care se menționează o creștere a conținutului de proteine în bob prin poliploidizare [4, 5, 22, 24]. Sporul în conținutul de proteine nu poate fi, însă, considerat ca o consecință doar a dublării numărului de cromozomi. Cercetările efectuate în această direcție au constatat că cantitatea proteinelor depinde în mare măsură de genotipul formei inițiale și, la poliploidizare, nivelul proteinei nu întotdeauna sporește [21]. Efectuând o analiză comparativă a bobelor sinteticului B tetraploid și a unui hibrid comercial diploid, J. E. Freeman și colaboratorii [6], au constatat că cele două tipuri de boabe nu se deosebesc după conținutul de proteine, grăsimi, amidon, etc.

De altfel, diferența constatată în cercetările efectuate după conținutul de proteină între sinteticul tetraploid B și hibridul diploid Porumbeni 331 MRf, care au același tip de endosperm (obișnuit) nu poate fi pusă doar pe seama nivelului de ploidie, deoarece nu se compară genotipuri cu origine similară.

Se cunoaște faptul că proteina din boabele de porumb, după calitățile biologice și nutritive, este neechilibrată din punct de vedere al conținutului de aminoacizi esențiali [20]. Lizina – un aminoacid esențial – de rând cu alți aminoacizi esențiali (triptofan, metionină, etc.), în bobul de porumb se găsește în cantități insuficiente, în special în endosperm.

Lucrările de ameliorare a calității proteinelor din bobul de porumb au luat o extindere mare în urma descoperirii efectului biochimic al genelor mutante *opaque-2* ( $o_2$ ) și *floury-2* ( $fl_2$ ), care în stare homozigotă controlează structura făinoasă a endospermului și modifică compoziția chimică a acestuia, determinând o acumulare sporită de lizină și triptofan în proteina din bob [8, 10]. În cercetările ulterioare efectul biochimic al acestor mutații endospermale a fost confirmat și utilizat în diverse programe de genetică și

ameliorare a porumbului la calitate [1, 16, 19, 23]. De altfel și în experiențele efectuate de noi, s-a constatat că hibridul simplu Chișiniovshi 307 PL, care include în genotipul său gena  $o_2$ , după conținutul de lizină depășește de două ori hibridul Porumbeni 331 MRf cu endosperm obișnuit. Concomitent, s-a observat că formele tetraploide, care încorporează în genotipul lor gena  $o_2$ , după cantitatea de lizină nu se deosebesc de hibridul diploid Chișiniovshi 307 PL.

**Tabelul 1. Caracteristica biochimică a unor forme experimentale de porumb tetraploid, recolta din anul 2011.**

Genotipul	Ploidia	% din substanța uscată a bobului					
		proteină	lizină	lizină/ proteină, %	amidon	lipide	celuloză
Porumbeni 331 MRf +/+	2n	10,93	0,30	2,74	70,91	4,82	-
Chișiniovshi 307 PL $o_2$	2n	12,05	0,52	4,32	71,88	4,98	4,03
Sin. B +/+	4n	13,04	0,38	2,91	69,58	3,72	3,77
P37-5 $o_2$	4n	13,52	0,54	3,99	68,55	3,87	4,11
P37-9 $o_2$	4n	13,17	0,55	4,19	69,96	3,98	4,14
P38-2 $o_2$	4n	14,06	0,59	4,20	67,84	3,76	3,85
P38-3 $o_2$	4n	12,98	0,51	3,93	70,14	3,96	4,09
P38-5 $o_2$	4n	14,46	0,56	3,87	67,06	3,48	4,12
P39-3 $o_2$	4n	14,08	0,52	3,69	67,78	3,88	4,21
P39-7 $o_2$	4n	13,63	0,50	3,67	70,89	4,13	4,18
U3-2 $o_2$	4n	15,08	0,52	3,45	67,50	3,99	3,99
U4-12 $o_2$	4n	15,39	0,62	4,03	67,50	3,85	3,84
U7-11 $o_2$	4n	14,34	0,56	3,91	69,88	3,94	3,76

Conținutul de amidon, de asemenea, are tendința de a fi mai redus față de diploizi, doar două derivate (P38-3, P39-7), fiind la un nivel cu aceștia. Reducerea conținutului de amidon are loc pe fondul creșterii conținutului de proteine. Conținutul de lipide în boabele tetraploide a relevat faptul că este mai scăzut comparativ cu cel al formei diploide mutante și, practic, la un nivel cu cel din boabele diploide normale.

Tendința formelor tetraploide de a conține mai puține lipide în boabe ar putea fi explicată prin schimbarea cotei embrionului în bob, deși unele cercetări infirmă schimbările în acest sens [6]. Se cunoaște că, incorporarea genei  $o_2$  în genotipul diploid sporește conținutul lipidelor pe contul măririi cotei embrionului [20], însă cu privire la formele tetraploide ce conțin gena  $o_2$ , astfel de informații în literatură, până în prezent nu au fost relatate.

Datele obținute în experiențele noastre arată că după conținutul de celuloză, formele diploide și tetraploide nu se deosebesc. Rezultate similare, au fost obținute și de alți cercetători [5].

Cercetările privind expresia mutației *opaque-2* la porumbul diploid, au demonstrat că manifestarea fenotipică a genei, grație naturii triploide a endospermului, are loc doar

în prezenţa a trei alele recesive în stare homozigotă a mutaţiei (trei doze) şi se manifestă prin consistenţă făinoasă a endospermului, iar în stare heterozigotă a genei *opaque-2* - boabele sunt sticloase. S-a constatat, de asemenea, că efectul biochimic al mutaţiei *opaque-2* este dependent de numărul de doze, astfel că odată cu mărirea numărului de doze a genei în endosperm, se intensifică acţiunea genei şi însuşirile biochimice ale boabelor cu expresie maximă în trei doze [2].

Până în prezent, datele din literatura specială cu privire la influenţa dozei genei  $o_2$  asupra conţinutului de lizină în genomul porumbului tetraploid sunt foarte modeste, fiind limitate la cercetările efectuate de M. I. Hadjinov şi V. S. Şcerbak [22], care nu au pus în evidenţă diferenţe semnificative în conţinutul de lizină în bob dintre formele mutante  $o_2$  diploide şi tetraploide. În legătură cu cele menţionate, unul din obiectivele cercetării noastre ţine de studiul mai aprofundat al influenţei mutaţiei  $o_2$  asupra conţinutului de lizină în formele de porumb tetraploid. În acest scop, în cercetările noastre au fost efectuate încrucişări reciproce ale unor forme tetraploide  $o_2$  cu sinteticul B tetraploid, care are endospermul sticlos.

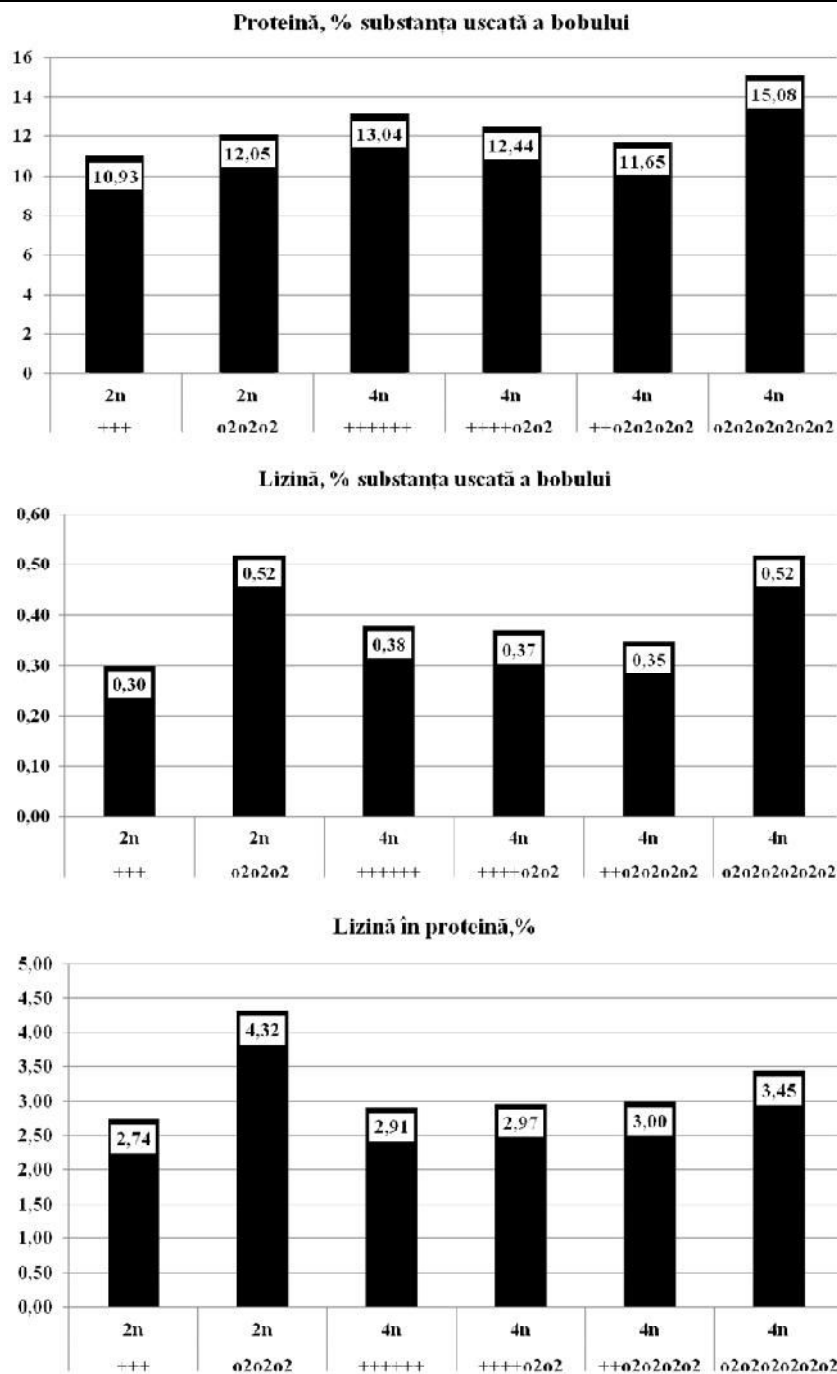
Boabele heterozigote obţinute din încrucişările reciproce au avut endospermul sticlos, chiar şi în prezenţa a 4 doze de gene recesive din 6 posibile. Prin urmare, influenţa alelelor sălbatice îşi păstrează însuşirile şi la nivel tetraploid. Din datele prezentate se observă că conţinutul de lizină în substanţa uscată şi în proteină în formele diploide cu endospermul sticlos (+++) este destul de redus, iar în prezenţa a 3 doze a genei  $o_2$  s-a remarcat o creştere esenţială a acestor indici (fig.2).

Concomitent, menţionăm că nu a fost observată o creştere proporţională a conţinutului de lizină în cazul numărului maximal de doze (6 alele recesive ale mutaţiei *opaque-2*). Această tendinţă nu este specifică numai pentru porumb, dar şi altor culturi, spre exemplu orzul, la care dublarea numărului de cromozomi a unor forme mutante cu conţinutul de lizină înalt, nu a rezultat sporuri în cantitatea de lizină [17].

În legătură cu datele obţinute de noi şi cele relatate în literatură cu privire la influenţa măririi nivelului de ploidie, inclusiv a efectului de doză a genei, la interpretarea rezultatelor cercetărilor necesită să fie luate în consideraţie şi acţiunea unei serii de alţi factori.

Celulele tetraploide sunt de două ori mai mari ca cele diploide, diferenţa fiind şi mai mare la nivelul endospermului. L. F. Randolph şi D. B. Hand [13], au remarcat că volumul celulelor endospermale la tetraploidii de porumb este de circa 3,5 ori mai mare ca volumul celulelor la diploizi. Sporul disproporţionat în volumul celulelor se datorează constituţiei lor hexaploide ce determină o activitate retardă a nucleului şi a diviziunii celulare. Deci, cu dublarea numărului de cromozomi, celulele devin mai mari, dar mai puţine la unitate de masă.

La extragerea probelor pentru analiză sunt studiate aceleaşi cantităţi de masă uscată, însă numărul celulelor este mai mic în masa uscată a tetraploizilor, dar mai grele, ceea ce echilibrează cantităţile. Pentru a confirma această ipoteză, J. A. Birchler [3], J. A. Birchler şi K. J. Newton [4], au determinat nivelul ADN hidrolizabil total la unele forme diploide şi tetraploide de porumb şi au constatat că cantitatea de ADN la mg substanţă uscată a fost aproape similară la toate formele. Adică, dacă în seria poliploidă fiecare genă se exprimă proporţional cu numărul de alele, rezultatele analizelor vor fi, practic, aceleaşi.



**Figura 2. Influența dozei genei *opaque-2* asupra conținutului de proteină și lizină în bobul de porumb diploid și tetraploid.**

Cercetările recente au demonstrat că expresia genelor la poliploizi rareori este aditivă, în majoritatea cazurilor existând o expresie non-aditivă ( $1+1<2$ ;  $1+1>2$ ) [7,14].

Expresia non-aditivă a genelor a fost menționată încă de L. F. Randolph și D. B. Hand [13], în studiul efectului genei *yellow-1* ( $y_1$ ) asupra conținutului de carotinoide la porumbul tetraploid, în care s-a constatat un spor de 5 ori mai mare în conținutul acestor pigmenți la o celulă tetraploidă, cantitatea condiționată de o genă fiind de 2,5 ori mai mare față de efectul genei în celulele diploide. Acest model explică și conținutul de proteină totală mai mare la tetraploizi, la care, unele gene responsabile de metabolismul proteinelor au efect non-aditiv.

Reieșind din cele expuse, conținutul de lizină în bobul de porumb aproape similar la formele diploide și tetraploide *opaque-2* din studiul de față, poate fi explicat ca fiind aditiv, cu un conținut aproape dublu de lizină per celulă la formele tetraploide.

Rezultatele obținute în cercetările noastre, vin să confirme faptul că mutația *opaque-2* are efect de doză în genomul tetraploid.

Existența efectului de doză la acest nivel, chiar în limite minime, ar putea avea o importanță deosebită pentru ameliorarea porumbului la calitatea bobului. În acest sens importanță prezintă cercetările efectuate de către N. Hristov [25], care a studiat indicii productivității, recoltei de boabe, conținutul de proteină și lizină în boabele unor hibrizi simpli tetraploizi obișnuiți timp de patru generații. Acesta a constatat că indicii studiați s-au schimbat în  $F_2$ - $F_4$  cu tendința de sporire sau menținere la nivelul  $F_1$ , conținutul de lizină fiind în creștere în generațiile următoare, în timp ce la diploizi - în descreștere. Aceasta stimulează, practic, continuarea cercetărilor privind îmbunătățirea calității biologice a boabelor de porumb, dar la un nou nivel – tetraploid, nivel prea puțin explorat la moment.

Această direcție capătă contur și din altă perspectivă, deoarece, dacă la etapele inițiale ale creării tetraploizilor, aceștia s-au dovedit a fi inferiori după însușirile culturale, în prezent există deja populații tetraploide net superioare diploizilor comerciali [24]. Crearea unor asemenea populații cu incorporarea unor gene ca *opaque-2* ar putea avea un impact economic deosebit.

### Concluzii

1. La formele tetraploide s-a remarcat tendința de sporire a conținutului de proteine și o reducere a conținutului de amidon și lipide în bob.

2. Mutația recesivă *opaque-2* nu a manifestat o influență relevantă asupra conținutului de lizină în proteină proporțională cu numărul de doze a genei în endospermul porumbului tetraploid.

### Bibliografie

1. Alexander D. E. Breeding for protein quality in maize: current issues and problems. // In: High Quality Protein Maize. Proc. CYMMYT: Purdue Symp. El- Batan, 1972. Stroudsburg, Pa, 1975, p. 83-85.
2. Bates L. S. Amino acid analysis. // Proc. of the high lysine corn conference. Washington, 1966, p.55-65.
3. Birchler J. A. The genetic basis of dosage compensation of alcohol dehydrogenase – 1 in maize. // Genetics, 1981, vol.97, №3-4, p.625-637.
4. Birchler J. A., Newton K. J. Modulation of protein levels in chromosomal dosage series of maize: the biochemical basis of aneuploid syndromes. // Genetics, 1981, vol.99, № 2 p.247-266.
5. Ellis G. H., Randolph L. F., Matrone G. A comparison of the chemical composition of

- diploid and tetraploid corn. // Journ. Agric. Research, 1946, vol.72, №3, p.123-130.
6. *Freeman J. E., Yahl K. R., Watson S. A.* A chemical and structural analysis of the caryopsis of an autotetraploid corn (*Zea Mays L.*). // Crop Sci., 1967, №7, p.655-658.
7. *Guo M., Davis D., Birchler J. A.* Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. // Genetics, 1996, vol.142, № 4, p.1349-1355.
8. *Mertz E. T., Bates L. S., Nelson O. E.* Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. // Science, 1964, vol.145, p.279-280.
9. *Messing J.* The polyploid origin of maize. // In: Handbook of maize: genetics and genomics, Jeff L. Bennetzen, Sarah C. Hake. eds. 2009. Springer. p.221-238.
10. *Nelson O. E., Mertz E. T., Bates L. S.* Second mutant gene affecting the aminoacid pattern of maize endosperm proteins. // Science, 1965, №150, p.1469-1470.
11. *Palii A., Batîru G.* Obținerea experimentală a formelor tetraploide de porumb opaque-2. // În: Ameliorarea porumbului și utilizarea androsterilității citoplasmatică în producerea de semințe, Materialele conf. intern. cons. m. cor.al AȘM Tihon Cealic – 90 ani de la naștere, Chișinău, 2011, p. 88-97.
12. *Randolph L. F.* Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. // Proc. Natl. Acad. Sci., 1932, Vol.18, p. 222-229.
13. *Randolph L. F., Hand D. B.* Relation between carotinoid content and number of genes per cell in diploid and tetraploid corn. // Journ. Agric. Research, 1940, vol.60, 51-64.
14. *Riddle N.C., et al.* Gene expression analysis at the intersection of ploidy and hybridity in maize. // Theor. Appl. Genet., 2010, №120, p.341-353.
15. *Rotari A. I.* Metodele genetico-biochimice a ameliorării porumbului la calitate. // Autoref. tezei de doctor hab. în științe biologice. Chișinău, 1993, 48 p.
16. *Rotari A.* Dezvoltarea cercetărilor biochimice, fiziologice și biotehnologice în ameliorarea și producerea semințelor de porumb în Republica Moldova. // În: Ameliorarea porumbului și utilizarea androsterilității citoplasmatică în producerea de semințe – Mater. conf. intern. cons. m. cor. al AȘM Tihon Cealic – 90 ani de la naștere, Chișinău, 2011, p.132-153;
17. *Tiwari S. P., Pai R. A., Bansal H. C.* Effect of autopolyploidy on quantity and quality of protein in barley. Theor. Appl. Genet., 1980, № 56, p.133-136.
18. *Кришченко В. П.* Ближняя инфракрасная спектроскопия. // М., АО “Интерагротех”, 1997, 638 с.
19. *Палий А. Ф., Чалык Т. С.* Состояние работы по селекции высоколизиновой кукурузы в Молдавии. // В кн.: Селекция высоколизиновой кукурузы. Труды Краснодарского НИИ сельского хозяйства, 1976, вып. II, с. 62-71.
20. *Палий А.* Генетические аспекты улучшения качества зерна кукурузы. // Кишинёв: Штиинца, 1989, 175с.
21. *Ротарь А. И., и др.* Биохимическая и морфологическая характеристика пыльцы и семян экспериментально полученных тетраплоидов кукурузы. Цитология и генетика, 1970, т.4, № 1, с.15-23.
22. *Хаджинов М. И., Щербак В. С.* Полиплоидия у кукурузы. Теоретические и практические проблемы полиплоидии. // Москва: Наука, 1974, с. 27-42.
23. *Хаджинов М. И., и др.* Высоколизиновые гибриды Краснодарского НИИ сельского хозяйства. // Труды Краснодарского НИИСХ, 1976, вып.11, с.3-15.
24. *Хатевов Э. Б.* Селекция тетраплоидной кукурузы на повышенную зерновую плодovitость. // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. Краснодар, 2009, с.55-59.
25. *Христов Н.* Проучване на добива и качеството на зърното на тетраплоидни прости хибриди царевица в  $F_1-F_4$ . // Генетика и селекция, 1981, год.14, №1, с. 49-55.