

Abordări metodologice pentru producerea dublu haploizilor de grâu și orz la INCDA Fundulea

(Methodological approaches for producing doubled haploids in wheat and barley at NARDI Fundulea)

Leonard-Alexandru Dumitru¹

Abstract

Doubled haploids (DH) are homozygous plants developed by androgenesis, gynogenesis, interspecific and wide hybridization. Using doubled haploid technology, it is possible to obtain homozygosity at all loci in a single generation and completely homogeneous breeding lines can be obtained in 1-2 years (one additional year for seeds). Therefore, this technology may significantly reduce cultivar development time in cereals. At National Agricultural Research and Development Institute Fundulea, the generation of haploid plants in wheat is accomplished by wide (intergeneric) hybridization through *Zea* method and in barley by interspecific hybridization through *Bulbosum* method.

This work reports the results obtained regarding the production of DH lines in wheat and barley at NARDI Fundulea in two years (2020-2021 and 2021-2022). In this study, a total of 29 winter wheat genotypes and 20 barley genotypes were subjected to the *Zea* and *Bulbosum* methods in order to obtain DH lines for the breeding programs.

For wheat, in 2021, a number of 170 DH lines were obtained from 20 genotypes (F1) and in 2022, 43 DH lines from nine genotypes. For barley, in 2021 a number of 42 DH lines were obtained from 10 genotypes (F1) and in 2022, 28 DH lines from 10 genotypes. Thus, *Zea* and *Bulbosum* biotechnological systems are efficient and rapid methods to achieve completely homozygous wheat and barley lines and the doubled haploid lines can be included successfully in breeding programs and in genetic studies.

Cuvinte cheie: dublu haploidie, metoda *Zea*, metoda *Bulbosum*, grâu, orz.

Keywords: doubled haploid, *Zea* method, *Bulbosum* method, wheat, barley.

INTRODUCERE

Procesul de ameliorare a plantelor de cultură și de înregistrare a soiurilor poate fi accelerat prin aplicarea metodelor biotehnologice care permit homozigotarea rapidă, într-o

¹INCDA Fundulea. E-mail: alexandru.dumitru0402@yahoo.com

singură generație a materialului de ameliorare prin obținerea plantelor haploide și dublu haploide (DH) (Săulescu și colab., 2012, Zargar și colab., 2022). Deoarece plantele dublu haploide sunt complet homozigote, soiurile obținute prin aceste metode sunt uniforme și stabile atât din punct de vedere genotipic, cât și fenotipic (Guan și colab., 2024). În cadrul programelor convenționale de ameliorare, liniile complet homozigote sunt rare, majoritatea selecțiilor având loci heterozigoți în constituția lor genetică. În prezent, metodele de dublu haploidie sunt avansate și prezintă numeroase avantaje, facilitând fixarea caracterelor de interes și contribuind la eficientizarea procesului de selecție (Niroula și Bimb, 2009). De asemenea, liniile DH reprezintă un material biologic valoros pentru studiile de analiză genetică, genomică, inginerie genetică și selecție asistată de markeri moleculari (Eliby și colab., 2022). Tehnologiile de dublu haploidie au fost aplicate cu succes la diverse plante de cultură precum grâu, orz, porumb, floarea soarelui, rapiță etc. (Săulescu și colab., 2010, Mihăilescu și Giura, 1998, Barbu și Giura, 2018, Kalinowska și colab., 2019).

Plantele haploide pot fi obținute prin metode bazate pe embriogeneză somatică sau embriogeneză zigotică. Embriogeneza somatică cuprinde tehnici specifice, *in vitro*, precum androgeneza (cultura de antere sau microspori) și ginogeneza, în timp ce embriogeneza zigotică presupune hibridări interspecifice sau intergenerice urmate de eliminarea cromozomilor paterni în stadiile incipiente de dezvoltare ale zigotului și de regenerarea plantelor haploide prin cultura *in vitro* a embrionilor.

În prezent, la INCDA Fundulea se desfășoară lucrări de homozigotare rapidă la două plante de cultură: grâu și orz. Plantele DH de grâu sunt obținute prin aplicarea metodei *Zea* bazată pe încrucișări intergenerice grâu x porumb, în timp ce plantele DH de orz sunt obținute aplicând metoda *Bulbosum* bazată pe încrucișări interspecifice orz x *Hordeum bulbosum* L.. Deși mai complexe, aceste metode au fost considerate superioare embriogenezei somatice datorită limitărilor acesteia, precum dependența de genotip, rata de inducere a embrionilor și capacitatea acestora de germinare, apariția frecventă a formelor poliploide, aneuploide și a plantelor albinotice (Giura și Mihăilescu, 2000, Zargar și colab., 2022).

Sistemele biotehnologice *Zea* și *Bulbosum* presupun parcurgerea unor etape importante:

- sincronizarea înfloritului la formele parentale,
- lucrări de hibridare,
- aplicarea tratamentelor cu fitohormoni,
- cultura *in vitro* a embrionilor haploizi și regenerarea plantelor,
- dublarea numărului de cromozomi pentru obținerea liniilor dublu haploide.

Eficiența programelor de inducere a haploidiei este determinată de genotipurile formelor parentale, de aplicarea tratamentelor cu fitohormoni și de asigurarea unor condiții ambientale optime dezvoltării plantelor. Atacul fungilor patogeni și al insectelor, stresul hidric (Santra și colab., 2017), fluctuațiile de temperatură, luminozitatea intensă și umiditatea sunt considerate factori de risc în hibridările îndepărtate (Mihăilescu și colab., 1994).

Obținerea embrionilor haploizi este dependentă de aplicarea tratamentelor cu reglatori de creștere (fitohormoni). Aceștia au rol în procese precum formarea cariopselor, formarea și dezvoltarea embrionilor, germinarea embrionilor *in vitro* și regenerarea plantelor

haploide (Giura și Mihăilescu, 2000). Principalii fitohormoni utilizați în programele de haploidie de la INCDA Fundulea sunt acidul 2,4-diclorofenoxiacetic (2,4-D) și acidul giberelic (GA3). Acidul 2,4 – diclorofenoxiacetic face parte din clasa auxinelor și este utilizat în tehnicile de embriogeneză somatică pentru inducerea calusogenezei și a organogenezei, iar în embriogeneza zigotică influențează procesele de formare și diferențiere ale embrionilor (Juzoń și colab., 2022). Acidul giberelic face parte din clasa giberelinelor și are rol în dezvoltarea cariopselor, influențând pozitiv longevitatea acestora și mărimea embrionilor (Devaux, 2003). Eficiența producerii de haploizi este influențată și de procentul de embrioni care germinează și regenerează plante haploide pe mediul de cultură. Printre factorii care condiționează germinarea embrionilor se enumeră gradul de diferențiere și dimensiunea embrionilor, momentul în care se realizează embriocultura și compoziția mediilor de cultură (Patial și colab., 2017).

La INCDA Fundulea sistemele biotehnologice *Zea* și *Bulbosum* au fost introduse de Dr. biolog Aurel Giura și Dr. biolog Alexandrina Mihăilescu în 1991.

MATERIAL ȘI METODE

Lucrarea prezintă rezultatele din doi ani de lucru (2020-2021 și 2021-2022) în care un total de 29 genotipuri de grâu și 20 genotipuri de orz au fost supuse protocolului specific metodelor *Zea* și *Bulbosum* pentru obținerea plantelor haploide și dublu haploide (tabelul 1).

Tabelul 1

Protocol pentru producerea liniilor dublu-haploide de grâu și orz la INCDA Fundulea (după Giura și Mihăilescu, 2000, actualizat)

(Protocol for producing wheat and barley doubled haploids at NARDI Fundulea
[after Giura and Mihăilescu, 2000, updated])

Nr. crt	Etape	Cerințe de temperatură și lumină	Perioadă și loc
1	Germinarea semințelor și vernalizarea plantelor de grâu și orz;	6 – 10° C	Noiembrie – Decembrie; camera de creștere, câmp
2	Semănarea și transplantarea porumbului	> 10° C	Decembrie – Februarie; laborator, seră
3	Transplantare plantelor vernalizate	12 -18° C	Ianuarie; seră
4	Lucrări de hibridare: • grâu x porumb • orz x <i>Hordeum bulbosum</i>	18 - 22° C	Martie – Mai; seră, câmp
5	Tratamente cu fitohormoni la 24 ore de la polenizare	18 - 22° C	Martie – Mai; seră, câmp
6	Recoltarea, sterilizarea și disecția cariopselor de grâu și orz; extragerea embrionilor	-	Martie – mai; seră, laborator

7	Embriocultură și regenerarea <i>in vitro</i> a plantelor haploide	întuneric 15 – 25 zile lumină 20 – 30 zile	Aprilie – Iunie; laborator
8	Cultivarea plantelor haploide	-	Mai - Iunie
9	Vernalizarea plantelor haploide	6 – 8° C; 45 zile	Iulie – August; spațiu cu climat dirijat
10	Inducerea stadiului de înfrățire	12 – 15° C	August – Septembrie; spațiu cu climat dirijat
11	Tratamente pentru dublarea numărului de cromozomi	-	Septembrie – Octombrie; laborator
12	Cultivarea plantelor dublu-haploide și recoltarea semințelor	-	Octombrie – Aprilie; seră

Sincronizarea înfloritului la formele parentale

Pentru obținerea liniilor DH prin **metoda Zea**, în anul de lucru 2020-2021, Laboratorul de Ameliorare a cerealelor păioase a furnizat 20 linii de grâu generația F1, iar în anul de lucru 2021-2022 nouă linii de grâu F1. Boabele de grâu au fost puse la germinat în vase Petri, iar plantele obținute au fost transplantate în ghivece cu pământ. Vernalizarea plantelor s-a realizat timp de 45 de zile la o temperatură de 6-8°C. După etapa de vernalizare, și inducerea stadiului de înfrățire plantele au fost transplantate în seră unde au fost asigurate condiții optime de temperatură și fotoperioadă.

Sursele de polen au fost reprezentate de hibridii de porumb zaharat „Estival” și „Deliciul verii” (figura 1) care se caracterizează prin precocitate, talie medie și o cantitate mare de polen. Boabele de porumb au fost germinate în vase Petri și ulterior semănate în seră în mai multe epoci pentru a asigura o cantitate adecvată de polen pe întreaga durată a programului de inducere a haploidiei.

Pentru obținerea liniilor DH prin **metoda Bulbosum**, în anul de lucru 2020-2021, Laboratorul de Ameliorare a cerealelor păioase a furnizat 10 linii de orz F1, iar în anul de lucru 2021-2022, 10 linii de orz F1. Deoarece lucrările de hibridare se desfășoară în condiții de câmp, boabele de orz au fost semănate în câmpul experimental.

Sursele de polen au fost reprezentate de citotipuri diploide ($2n=2x=14$), perene de *Hordeum bulbosum* L. (figura 1) din colecția *Laboratorului Fenotipare și genotipare*.



Figura 1 – Surse de polen: hibridi de porumb zaharat (stg.) și *Hordeum bulbosum* L. (dr.)
(Pollen sources: sweet maize hybrids (left) and *Hordeum bulbosum* L. (right))

Lucrări de hibridare

În procesul de obținere a embrionilor haploizi, atât plantele de grâu cât și cele de orz sunt utilizate ca genitori materni astfel încât este necesară înlăturarea organelor reproducătoare masculine (staminele) (figura 2). De asemenea, este importantă aprecierea stadiului optim de dezvoltare al spicului în care va fi efectuată castrarea. Polenizarea (figura 2) se realizează cu polen proaspăt recoltat, utilizând o pensulă atunci când stigmatul prezintă un aspect de pană. Atât după castrare, cât și după polenizare spicele au fost acoperite cu pungi confecționate din hârtie cerată pe care au fost notate informații de interes (data castrării, data polenizării, genotipul patern).



Figura 2 – Lucrări de hibridare la grâu: castrare (stg.) și polenizare (dr.)
[Hybridization in wheat: emasculation (left) and pollination (right)]

Tratamente cu fitohormoni

Tratamentele cu hormoni vegetali au fost efectuate la 24 ore după polenizare prin pulverizare la nivelul spicului. Dozele aplicate au variat în funcție de plantă. Astfel, la grâu a fost aplicată varianta 2,4-D 20 ppm + GA₃ 75 ppm, iar la orz a fost aplicată varianta 2,4-D 10 ppm + GA₃ 75 ppm (1:4). După aplicarea tratamentelor spicele au fost acoperite cu pungă din hârtie cerată (figura 3).



Figura 3 – Plante de grâu după tratamentele cu fitohormoni
(Wheat plants after treatments with plant growth regulators)

Embriocultura și regenerarea plantelor haploide

La 14 zile după polenizare spicele au fost recoltate iar cariopsele au fost sterilizate și disecate (în condiții de laborator). Cariopsele haploide se disting de cele obținute prin autofecundare prin absența endospermului. Cariopsele au fost sterilizate cu alcool etilic 90° timp de 30 secunde, apoi au fost imersate în soluție de hipoclorit de sodiu 10%, timp de 15 minute și în final, spălate de 2-3 ori cu apă sterilă. Disecția cariopselor s-a realizat sub lupa binocular în condiții aseptice la nișă cu flux laminar.

Pentru cultura *in vitro* a embrionilor haploizi de grâu și orz a fost folosit mediul nutritiv solid Gamborg B5 modificat. Vasele de cultură cu embrioni au fost păstrate în condiții de întuneric și temperatură la nivelul camerei timp de 15 până la 25 zile, ulterior fiind transferate în condiții de lumină naturală. Când plantele haploide regenerate (figura 4) au atins faza optimă de dezvoltare, acestea au fost transplantate în ghivece cu pământ și au fost supuse etapelor de vernalizare și inducere a stadiului de înfrățire.



Figura 4 – Regenerarea in vitro a plantelor haploide de orz (stg.) și grâu (dr.)
[In vitro regeneration of barley (left) and wheat (right) haploid plants]

Dublarea numărului de cromozomi

După vernalizare și inducerea stadiului de înfrățire, plantele haploide de grâu și orz au fost supuse tratamentului chimic cu colchicină pentru dublarea numărului de cromozomi și restabilirea fertilității. Colchicina, un alcaloid toxic cu efect antimitotic, inhibă funcționarea normală a fusului de diviziune astfel încât celulele nu se mai divid și rămân cu un număr dublu de cromozomi (Santra și colab., 2017).

Plantele în stadiul de 1-3 frați au fost scoase din pământ, iar rădăcinile au fost spălate cu apă de la robinet și tăiate la jumătate din lungimea lor. Ulterior, plantele au fost imersate până la 2 cm deasupra nodului de înfrățire într-o soluție de colchicină (0,1%) + dimetilsulfoxid (DMSO) (2%) timp de 3 ½ ore la grâu și 4 ore la orz. După aplicarea tratamentului, plantele au fost spălate cu apă și transplantate în ghivece cu pământ unde s-a menținut un nivel ridicat de umiditate.

Deoarece plantele haploide au jumătate din numărul de cromozomi, determinarea gradului de ploidie nu este necesară. Cu toate acestea, înainte de aplicarea tratamentelor de dublare se pot recolta probe (vârful rădăcinilor) pentru determinarea numărului de cromozomi, utilizând metoda Feulgen de colorare pe preparate squash (figura 4 și figura 5) (Giura și Mihăilescu, 1995)



Figura 4 – *Triticum aestivum* L. Metafaza mitotică la planta haploidă $n=21$ cromozomi (stg.) și la planta dublu-haploidă $2n=42$ cromozomi (dr.);
(*Triticum aestivum* L. Mitotic metaphase of haploid plant with 21 chromosomes (left) and DH plant $2n=42$ chromosomes (right))



Figura 5 – *Hordeum vulgare* L. Metafaza mitotică la planta haploidă $n = 7$ cromozomi (stg.) și la planta dublu-haploidă $2n = 14$ cromozomi (dr.)
(*Hordeum vulgare* L. Mitotic metaphase of haploid plant with 7 chromosomes (left) and DH plant $2n = 14$ chromosomes (right))

Cultivarea plantelor dublu-haploide a avut loc în spații cu climat controlat până la formarea și recoltarea semințelor DH.

Evaluarea randamentului programelor de haploidie la grâu și orz a fost realizată utilizând următorii parametri pentru capacitatea de încrucișare și formare a embrionilor, precum și pentru germinarea *n vitro* a embrionilor haploizi:

- S/S – cariopse formate la 100 flori polenizate;
- SD/F – cariopse disecate la 100 flori polenizate;

- E/F – embrioni formați la 100 flori polenizate;
- E/SD – embrioni formați la 100 cariopse disecate;
- EC/SD – embrioni cultivați la 100 cariopse disecate;
- EG/EC – embrioni germinați la 100 embrioni cultivați;
- E/SP – embrioni pe spic.

Parametrul pentru eficiența producerii de haploizi s-a calculat atât la orz cât și la grâu după formula $HPE = SD/F \times EC/SD \times P/EC$, unde $P/EC =$ plante haploide la 100 embrioni cultivați (Mihăilescu și colab., 1998).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru grâu, în anul 2021 au fost polenizate 1.327 spice și disecate 18.090 de cariopse.

Au fost cultivați in vitro 1.793 de embrioni, dintre care 44% au regenerat plante haploide pe mediul de cultură, 20% au prezentat organogeneză incompletă, iar 36% nu au germinat. Din cele 795 plante haploide regenerare, 630 au fost supuse tratamentelor de dublare a numărului de cromozomi. Astfel, au fost obținute 170 linii DH pentru 19 din 20 de genotipuri F1.

În anul 2022, au fost polenizate 957 spice de grâu și 11.204 cariopse au fost disecate. Au fost cultivați in vitro 624 embrioni, dintre care 44% au regenerat plante haploide, 11% au prezentat organogeneză incompletă, iar 45% nu au germinat. Din cele 273 plante haploide regenerare, 178 au fost supuse tratamentelor de dublare a numărului de cromozomi. Astfel, au fost obținute 43 linii DH pentru toate cele nouă genotipuri F1.

Volumul materialului de lucru este prezentat în tabelul 2.

Tabelul 2

Materialul biologic din diferite etape ale producerii de DH la grâu
(The biological material from different stages of DH production in wheat)

An	Nr. genotipuri	Nr. spice lucrate	Nr. cariopse disecate	Nr. embrioni	Nr. plante regenerare	Nr. plante colchicinizate
2021	20	1.327	18.090	1.793	795	630
2022	9	957	11.204	624	273	178

Pentru evaluarea randamentului programului de haploidie la grâu au fost analizați parametrii din tabelul 3. Parametrii care exprimă compatibilitatea de încrucișare și efectul tratamentelor cu hormoni vegetali (S/S, SD/F, E/F, E/SP) au înregistrat valori mai ridicate în 2021 comparativ cu 2022. Aceste valori evidențiază numărul mai mic de cariopse formate și, implicit, de embrioni.

Capacitatea de germinare a embrionilor (EG/EC) a avut valori mai scăzute în 2022 (55,2) comparativ cu 2021 (63,8). În anul 2022, aproximativ jumătate din embrionii cultivați (45%) nu au germinat pe mediul de cultură. Capacitatea de germinare a

embrionilor a fost influențată de mărimea și gradul de diferențiere al acestora. Valoarea parametrului P/EC a fost similară în ambii ani (44,3 în 2021, respectiv 43,7 în 2022), plantele haploide regenerare în vitro fiind verzi, viabile, având organe complet dezvoltate.

Indicele HPE a avut valori semnificativ mai reduse în anul 2022 (1,42) comparativ cu anul 2021 (2,99). Rezultatele mai slabe din anul 2022 au fost determinate de factorii ambientali din seră, dar și de cantitatea insuficientă de polen de porumb într-o anumită perioadă.

Temperatura are un rol important în programele de haploidie, aceasta condiționând viabilitatea polenului, fecundarea și formarea embrionilor. De exemplu, Khan și Ahmad, 2011 au observat că temperatura optimă pentru polenizare este 21-26 °C.

Tabelul 3

Parametrii de evaluare a randamentului producerii de plante haploide la grâu
(Parameters for evaluating the haploid plant production in wheat)

An	Parametrii								
	S/S	SD/F	E/F	E/SD	EC/SD	EG/EC	E/SP	P/EC	HPE
2021	68,16	68,16	6,75	9,11	9,11	63,8	1,35	44,33	2,99
2022	58,65	58,65	3,26	5,56	5,56	55,28	0,65	43,75	1,42

Comparând trei parametri de eficiență în producerea plantelor haploide prin metoda *Zea*, respectiv SD/F, EC/SD și P/EC din anii 2021 și 2022 cu martorii din 1996 (SD/F = 58,3, EC/SD = 27,1, P/EC = 66,1) (Giura și Mihăilescu, 2000), (figura 6) se pot observa următoarele aspecte:

- Procentul de semințe disecate la 100 flori polenizate (SD/F) a avut o valoare medie ridicată în anul 2021 și similară în anii 1996 și 2022.
- Procentul de embrioni cultivați din cariopse disecate (EC/SD) a fost semnificativ mai ridicat în 1996 comparativ cu 2021 și 2022. Acest parametru evidențiază și numărul mare de embrioni formați în 1996.
- Valoarea parametrului P/EC a fost mai ridicată în 1996 comparativ cu anii 2021 și 2022 datorită numărului mai mare de embrioni cultivați, dar similară în anii 2021 și 2022.

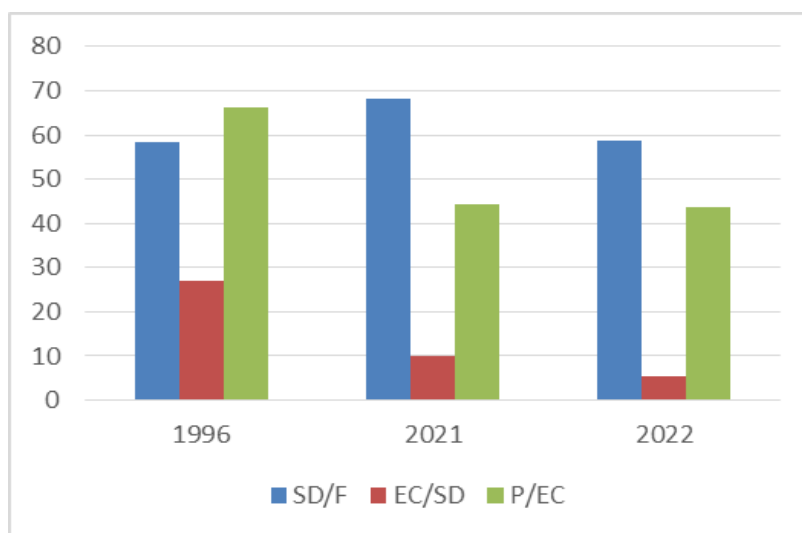


Figura 6 – Compararea unor parametri de eficiență în producerea plantelor haploide prin metoda *Zea*, SD/F - cariopse disecate la 100 flori polenizate, EC/SD – embrioni cultivați la 100 cariopse disecate , P/EC - plante haploide la 100 embrioni cultivați;
(Comparison of efficiency parameters in haploid plant production using the *Zea* method, SD/F - caryopses dissected per 100 pollinated flowers, EC/SD - embryos cultured per 100 dissected caryopses, P/EC - haploid plants per 100 cultured embryos)

Pentru orz, în anul 2021 au fost polenizate 428 spice și disecate 5.410 de cariopse. Au fost cultivați in vitro 2.895 embrioni, dintre care 27% au regenerat plante haploide pe mediul de cultură, 47% au prezentat organogeneză incompletă, iar 26% nu au germinat.

Din cele 766 plante haploide regenerare, 535 au fost supuse tratamentelor de dublare a numărului de cromozomi. Astfel, au fost obținute 42 linii DH pentru cele 10 genotipuri F1.

În anul 2022, au fost polenizate 357 spice de orz și disecate 2.850 de cariopse. Au fost cultivați in vitro 1.529 embrioni, dintre care 25% au regenerat plante haploide, 23% au prezentat organogeneză incompletă, iar 52% nu au germinat. Din cele 383 plante haploide regenerare, 272 au fost supuse tratamentelor de dublare a numărului de cromozomi. Astfel, au fost obținute 28 linii DH pentru cinci din cele 10 genotipuri F. Volumul materialului de lucru este prezentat în tabelul 4.

Tabelul 4

Materialul biologic din diferite etape ale producerii de DH la orz
(The biological material from different stages of DH production in barley)

An	Nr. genotipuri	Nr. spice lucrate	Nr. cariopse disecate	Nr. embrioni	Nr. plante regenerare	Nr. plante colchicinizate
2021	10	428	5.410	2.895	766	535
2022	10	357	2.850	1.529	383	272

Pentru evaluarea randamentului programului de haploidie la orz au fost analizați parametrii din tabelul 5. În anul 2022, parametrii care exprimă compatibilitatea de încrucișare și efectul tratamentelor cu hormoni vegetali (S/S, SD/F, E/F, E/SP) au avut valori semnificativ mai mici comparativ cu 2021. De asemenea, procentul embrionilor formați este mai scăzut în 2022. Parametrii E/SD și EC/SD au avut valori similare în ambii ani, însă se remarcă o scădere a procentului de embrioni germinați (EG/EC) în 2022. Dacă în anul 2021 procentul cel mai mare de embrioni (47%, comparativ cu 23% în 2022) s-a caracterizat prin organogeneză incompletă și calusogeneză, în anul 2022 mai mult de jumătate din embrioni (52%, comparativ cu 26% în 2021) nu au germinat pe mediul de cultură. Procentul ridicat de embrioni negerminați a fost condiționat de numărul mare de embrioni mici, nediferențiați cu potențial scăzut de germinare in vitro, în timp ce organogeneza incompletă poate fi influențată de acțiunea hormonului auxinic 2,4-D. În concentrații ridicate, acest fitohormon acționează ca inhibitor în procesele de formare ale cariopselor, germinare in vitro a embrionilor și regenerare de plante haploide (Mihăilescu și colab., 1998). Este de menționat că în ambii ani a fost folosită aceeași variantă de tratament cu hormoni vegetali. Aceste aspecte evidențiază rolul și importanța tratamentelor cu fitohormoni și a factorilor de mediu în programele de dublu haploidie. Deoarece hibridările *H. vulgare* x *H. bulbosum* se realizează în câmpul experimental, factori precum temperatura scăzută din timpul nopților și umiditatea ridicată sau ploile au avut efect nefavorabil asupra calității polenului de *H. bulbosum*, influențând eficiența hormonilor vegetali și, implicit procesele de fecundare și formare a cariopselor și embrionilor.

Parametrul P/EC a avut o valoare mai scăzută în anul 2022 (25,04, comparativ cu 26,45 în 2021), dar plantele haploide regenerate in vitro au fost viabile, complet dezvoltate.

Indicele HPE a avut valoare mai mare în anul 2021 (9,93, comparativ cu 5,94 în 2021) datorită numărului ridicat de cariopse disecate.

Tabelul 5

Parametrii de evaluare a randamentului producerii de plante haploide la orz
(Parameters for evaluating the haploid plant production in barley)

An	Parametrii								
	S/S	SD/F	E/F	E/SD	EC/SD	EG/EC	E/SP	P/EC	HPE
2021	70,22	70,22	37,57	53,51	53,51	72,40	6,76	26,45	9,93
2022	44,25	44,25	23,79	53,64	53,64	44,93	4,28	25,04	5,94

Comparând trei parametri de eficiență în producerea plantelor haploide prin metoda Bulbosum, respectiv SD/F, EC/SD și P/EC din anii 2021 și 2022 cu martorii din 1996 (SD/F = 35.5, EC/SD = 39.4, P/EC = 25.5) (Giura și Mihăilescu, 2000), (figura 7) se pot observa următoarele aspecte:

- Procentul de semințe disecate la 100 flori polenizate (SD/F) a avut valoare medie ridicată în anul 2021 comparativ cu anii 1996 și 2022.
- Procentul de embrioni cultivați din cariopse disecate (EC/SD) a avut valori similare în 2021 și 2022, dar mai ridicate comparativ cu 1996.
- Valoarea parametrului P/EC a fost similară în toți cei trei ani.

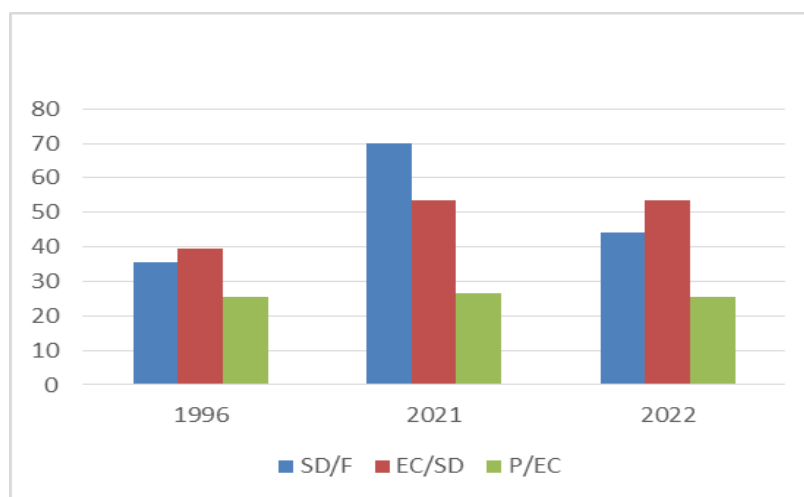


Figura 7 - Compararea unor parametri de eficiență în producerea plantelor haploide prin metoda Bulbosum, SD/F - cariopse disecate la 100 flori polenizate, EC/SD – embrioni cultivați la 100 cariopse disecate, P/EC - plante haploide la 100 embrioni cultivați;
(Comparison of efficiency parameters in haploid plant production using the *Bulbosum* method, SD/F - caryopses dissected per 100 pollinated flowers, EC/SD - embryos cultured per 100 dissected caryopses, P/EC - haploid plants per 100 cultured embryos)

CONCLUZII

- Sistemele biotehnologice Zea și Bulbosum reprezintă metode rapide și sigure pentru inducerea homozigoției într-o singură generație la grâu și, respectiv orz.
- Metodele de dublu haploidie prezintă numeroase avantaje, precum reducerea duratei programelor de ameliorare și creșterea presiunii de selecție.
- Liniile DH de grâu și orz pot fi integrate cu succes în programele de ameliorare și în studiile de genetică.
- Eficiența metodelor de dublu haploidie este condiționată de respectarea tuturor etapelor de lucru, dar și de factorii ambientali (temperatură, umiditate), aceștia influențând procese precum fecundarea, formarea cariopselor și a embrionilor haploizi.

Sursa de finanțare • Proiectul Nucleu PN 23.18 “Adaptarea principalelor culturi agricole la schimbările climatice prognozate pentru România, prin metode genetice și tehnologice moderne”, subproiectul PN 23.18.01.01 “Abordări moleculare, citogenetice și fiziologice pentru adaptarea cerealelor la schimbări climatice”, Contract 43N/2023, finanțat de Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- BARBU, S.P., GIURA, A., LAZĂR, C., 2018 – *Potential sources of new genetic variability in mutant and mutant/recombinant wheat DH-lines*. Rom. Agr. Res., nr. 35, p: 81-87.
- ELIBY, S., BEKKUZHINA, S., KISHCHENKO, O., ISKAKOVA, G., KYLYSHBAYEVA, G., JATAYEV, S., SOOLE, K., LANGRIDGE, P., BORISJUK, N., SHAVRUKOV, Y., 2022 – *Developments and prospects for doubled haploid wheat*. Biotechnology Advances 60, 108007.
- DEVAUX, P., 2003 – *The Hordeum bulbosum (L.) method. Doubled Haploid Production in Crop Plants A Manual, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 15-19.
- GIURA, A., MIHĂILESCU, A., 1995 – *Eficiența clonării și a dublării numărului de cromozomi pentru obținerea de linii dublu haploide (DH) la grâu și orz.. Analele Institutului de Cercetări pentru Cereale și Plante Tehnice Fundulea VOL. LXII. 7-16.*
- GIURA, A., MIHĂILESCU, A., 2000 – *Metode moderne de reducere a duratei programelor de ameliorare la grâu și orz. Metode de Cercetare în Cultura Plantelor, Editura Agris, București, 17-36.*
- GUAN, X., PENG, J., FU, D., 2024 – *Technology for Production of Wheat Doubled Haploid via Maize Pollen Induction—Updated Review. Agronomy 14(2): 375.*
- JUZOŃ, K., WARCHOŁ, M., DZIURKA, K., CZYCZYŁO-MYSZ, A I.M., MARCIŃSKA, I., SKRZYPEK, E., 2022 – *The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of oat (Avena sativa L.) doubled haploid lines through wide hybridization. PeerJ. 10:e12854, <https://doi.org/10.7717/peerj.12854>.*
- KALINOWSKA, K., CHAMAS, S., UNKEL, K., DEMIDOV, D., LERMONTOVA, I., DRESSELHAUS, T., KUMLEHN, J., DUNEMANN, F., HOUBEN, A., 2019 – *State-of-the-art and novel developments of in vivo haploid technologies. Theoretical and Applied Genetics 132(3):593-605.*
- KHAN, M. A., AHMAD, J., 2011 – *In vitro wheat haploid embryo production by wheat x maize cross system under different environmental conditions. Pakistan Journal of Agricultural Research 48(1), 49-53.*
- MIHAILESCU, A., GIURA, A., BUDE, A., 1994 – *Increasing efficiency of barley haploid production by combined treatments with plant growth regulators applied in vivo. Romanian Agricultural Research 2:25-33.*
- MIHAILESCU, A., GIURA, A., BUDE, A., 1998 – *Sistemul biotehnic Bulbosum la orz – 5 ani de aplicare la I.C.C.P.T. Fundulea.. Cercetări De Genetică Vegetală și Animală, VOL. V, 93-120.*
- MIHAILESCU, A., GIURA, A., 2018 – *Evaluation of pollinators (Zea mays L. and Hordeum bulbosum L.) for wheat and barley haploid production. Rom. Agr. Res., nr. 9-10, p: 39-44.*
- NIROULA, R.K., BIMB, H.P., 2009 – *Overview of wheat x maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. World Applied Sciences Journal 7(8), 1037-1045.*
- PATIAL, M., PAL, D., THAKUR, A., BANA, R.S., PATIAL, S., 2019 – *Doubled Haploidy Techniques in Wheat (Triticum aestivum L.): An Overview. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 89, 27–41.*
- SANTRA, M., WANG, H., SEIFERT, S., HALEY, S., 2017 – *Doubled Haploid Laboratory Protocol for Wheat Using Wheat–Maize Wide Hybridization. Wheat Biotechnology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 1679:235–249.*
- NN., SĂULESCU, G., ITTU, A., GIURA, M., CIUCĂ, MUSTĂȚEA, P., ITTU, M., SERBAN, G., NEACȘU, AF., 2010 – *Diversificarea bazei genetice ca fundament al progresului în ameliorarea grâului. Analele INCDA Fundulea, vol LXXVIII, p: 7-20.*
- ZARGAR, M., ZAVARYKINA, T., VORONOV, S., PRONINA, I., BAYAT, M., 2022 – *The Recent Development in Technologies for Attaining Doubled Haploid Plants In Vivo. Agriculture 12, 1595.*