UDC: 575.224:633.16:535-36 https://doi.org/10.53040/gppb8.2024.41

DETERMINAREA RADIOSENSIBILITĂȚII ȘI DOZELOR OPTIME MUTAGENE A RAZELOR X LA ORZUL DE TOAMNĂ

Grigorov Tatiana
Institutul de Genetică, Fiziologie şi Protecţie a Plantelor, USM, Chişinău, Republica Moldova
https://orcid.org/0000-0003-1906-4322, e-mail: tatiana.grigorov@sti.usm.md

Summary. The impact of ten X-ray doses (150, 170, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, and 530 Gy) on seed germination, survivability, and seedling length of winter barley varieties Igri, Ciuluc, Strălucitor, and hybrid lines *Ciuluc x Igri - 5As, Strălucitor x Igri - 9B* has been evaluated. All winter barley genotypes exhibited germination rates between 70% and 93.3% across all X-ray doses. ANOVA revealed significant differences between genotypes, X-ray doses, and the genotype by dose interaction for seedling length. The irradiation doses that led to a 30-50% reduction in seedling growth (GR 30-50) were 150 Gy for cv. Igri, 300-350 Gy for cv. Strălucitor and cv. Ciuluc, and 200-250 Gy for hybrid lines *Strălucitor x Igri - 9B* and *Ciuluc x Igri - 5As*. Based on the evaluation of radiosensitivity curves and considering the specific genotype response to X-ray doses, doses of 200-250 Gy were selected as optimal.

Keywords: winter barley, X-rays, radiosensitivity, optimal mutagenic dose, LD_{30-50}, GR_{30-50}.

Introducere

Seceta este constrângerea principală a mediului care deseori are efect drastic asupra culturilor cerealiere, inclusiv orzul. Rata soiurilor mutante de cerealiere tolerante la secetă, obținute prin implicarea radiațiilor ionizante constituie 51% din numărul total de soiuri ce prezintă toleranță, ceea ce demonstrează eficiența acestor factori mutageni [9]. În același timp, cota soiurilor de orz tolerante la secetă constituie 13% din numărul total de soiuri cerealiere realizate prin intermediul razelor ionizante (radiația gama și raze X), ceea ce denotă necesitatea de a eficientiza procedeele de obținere a soiurilor de orz cu toleranță la stresul hidric prin intermediul acestor agenți mutageni. În plus, toate soiurile mutante de orz cu toleranță la secetă sunt soiuri de orz de primăvară. Astfel, prezintă interes evaluarea potențialului destabilizant al radiațiilor ionizante, precum sunt razele X în evidențierea răspunsului diferențiat al genotipurilor de orz de toamnă în condiții de deficit hidric. Pentru obținerea unei variabilități eficiente la 3 soiuri și 2 linii hibride de orz de toamnă prin intermediul iradierii cu raze X este necesar de a determina radiosensibilitatea și dozele optime mutagene de radiație. Ulterior, dozele identificate vor fi utilizate pentru obținerea plantelor mutante de orz de toamnă care vor fi implicate în programe de ameliorare a toleranței la deficitul hidric și secetă.

Materiale și metode

În calitate de material biologic au fost utilizate 3 soiuri de orz de toamnă (*Hordeum vulgare* L., 2n=14): Igri (spic cu 2 rânduri, Marea Britanie, 2/0129), Ciuluc, Strălucitor (spic cu 4 rânduri, Republica Moldova) și 2 linii hibride: *Ciuluc x Igri - 5As(CxI-5As), Strălucitor x Igri - 9B*(*SxI-9B*), spice cu 2 rânduri de boabe.

Pentru determinarea dozelor optime mutagene a razelor X au fost aplicate scheme de pretratament și iradiere conform *protocolul de testare a radiosensibilității* [6]. Prin urmare, semințele de orz de toamnă (câte 30 de boabe per doză) au fost plasate în pachete de hârtie permiabile pentru apă și puse în desicator cu soluție de glicerol 60% pentru ajustarea gradului optim de umiditate (12-14%), timp de 4 zile. Umiditatea relativă de 73% a fost monitorizată cu ajutorul unui higrometru. Gradul de umiditate în boabele de orz a fost determinat cu ajutorul aparatului Radwag și a constituit 12,3%.

Ulterior, semințele au fost ambalate în pungi impermeabile pentru menținerea umidității optime și expediate la instalația de iradiere cu raze X-RS-2400, unde au fost iradiate conform procedurii standard [8]. Boabele au fost expuse iradierii în 10 doze (150, 170, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 și 530 Gy) selectate în dependență de dozele letale (DL 50) recomandate pentru orz în literatura de specialitate [6].

În aceeași zi, semințele de orz au fost dezinfectate în soluție de hipoclorit de Na de 10% cu adaos de soluție de Tween 20 (2-3 picături), timp de 10 minute și clătite în apă distilată sterilă (de 3 ori), pentru a evita contaminarea cu fungi. Apoi, boabele de orz au fost puse la germinat în cutii Petri sterile, (preventiv pregătite, etichetate, cu două straturi de hârtie de filtru), în apă distilată, în condiții controlate de temperatură (20 ± 2^0C) la întuneric, în termostat.

La a 8-a zi de când semințele au fost puse la germinat, au fost înregistrate: numărul de semințe germinate (formarea radiculei și coleoptilului), numărul de plantule și lungimea medie a lor în faza Z 7-11 (faza de apariție a coleoptilului și răsărire a primei frunze) conform scării Zadocks.

Pentru fiecare variantă au fost estimate: rata germinării (RG,%), rata plantulelor în stadiul Z11 (RP,%) și lungimea medie a plantulelor în stadiu Z11 și Z7-11 (LMPZ7-11, LMPZ11, cm), reducerea creșterii cu 30, 50% (RC 30, 50) și doza letală a 30%, 50% la etapa de plantulă (DLP 30, 50).

Rezultate și discuții

Inducerea eficientă a mutagenezei prin intermediul razelor ionizante, este determinată de echilibrul între probabilitatea înaltă de a induce mutații și letalitatea redusă. Conform datelor din literatură, [1,5,6,7,8] pentru a obține o variabilitate eficientă este necesară determinarea dozelor de iradiere X care sunt asociate cu mortalitatea a 30, 50% din plante (DL30, 50), precum și dozele ce reduc indicii de creștere a plantelor cu 30, 50% comparativ cu varianta martor (RC 30, 50), ori estimarea diferenței lungimii plantulelor dintre variantele experimentale și martor, exprimate ca procent din varianta control (%). Astfel, în scopul stabilirii DL30 și 50 a razelor X, la etapa germinării a boabelor de orz de toamnă a fost estimat parametrul RG, care a atins valori înalte pentru toate dozele selectate, la 5 din 6 genotipuri evaluate. Valorile RG au variat de la 70,0-100,0% pentru s. Igri; 93,3-100,0% pentru s. Ciuluc, s. Strălucitor, forma hibridă *CxI-5As* și 80,0-100,0% pentru linia hibridă *SxI-9B* (Figura 1, Tabelul 1).

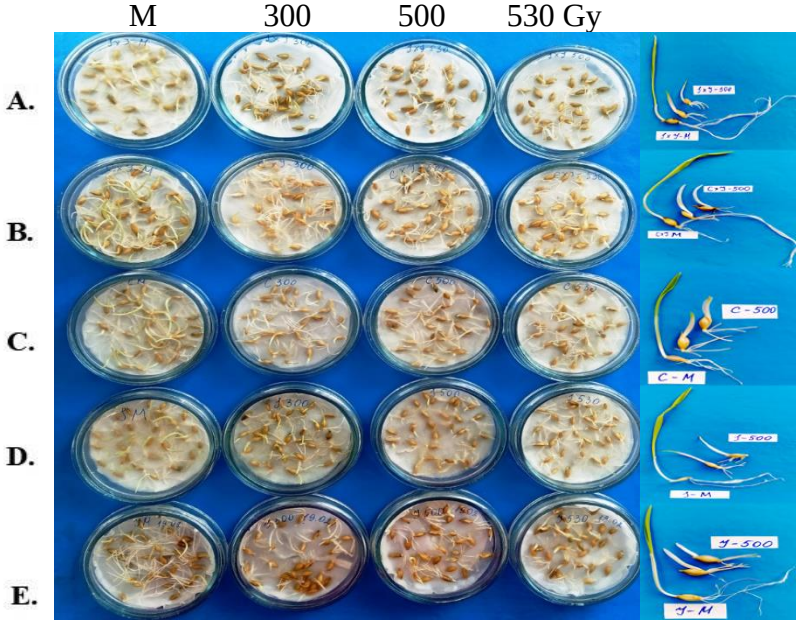


Figura 1. Germinarea boabelor de orz la diferite doze ale radiației X (300, 500, 530 Gy) și dezvoltarea plantulelor (Martor, 500 Gy): A – *S x I-9B*; B – *C x I-5As*; C – Ciuluc; D – Strălucitor; E – Igri.

Acest fapt, nu a permis stabilirea dozei letale a 30-50% (DL30,50) la etapa respectivă și indică despre necesitatea stabilirii indicelui *RP* și estimarea DLP 30, 50 la etapa de plantulă. De menționat că, valori înalte ale indicelui de germinare a semințelor iradiate cu diferite doze de radiație gama au fost relatate la două soiuri de grâu de toamnă [4] similar rezultatelor noastre, în timp ce alți autori menționează despre diferențe semnificative ale valorilor RG la alte soiuri de grâu [2]. Aceste date indică despre faptul că efectul radiației ionizante și gradul de sensibilitate depinde de specie, soi, mărimea boabelor, gradul de umiditate a semințelor iradiate și alți factori [6, 8].

În rezultatul analizei parametrului *RP* s-a remarcat reacția specifică de genotip la acțiunea diferitelor doze de raze X, determinată de sensibilitatea diferită a soiurilor de orz de toamnă supuse iradierii. Cea mai mică valoare a indicelui *RP* a fost estimată pentru s. Igri și a constituit 9,52% la 350 Gy, iar la doza de 400 Gy nu au fost înregistrate plantule în faza Z11. Acest rezultat denotă faptul că acest genotip este mai sensibil la acțiunea radiației X comparativ cu celelalte genotipuri, s. Ciuluc, unde la doza de 450 Gy valorile RP a constituit 13,33%, s. Strălucitor – 28,57% la doza de 500 Gy, forma hibridă *CxI-5As*– 16,67% (400 Gy). Iar pentru hibridul *SxI-9B* parametru *RP* a atins valoarea de 11,54% la doza de 530 Gy (Tabelul 1).

Tabelul 1

Acțiunea diferitelor doze de raze X asupra ratei germinării (RG), ratei plantulelor (RP) și lungimii medii a plantulelor (LMP) la orzul de toamnă

Genotip/ Indici calculați		Dozele de iradiere cu raze X, Gy										
		0	**150**	**170**	**200**	**250**	**300**	**350**	**400**	**450**	**500**	**530**
Igri	**RG,%**	100,0	96,7	100,0	86,7	96,7	90,3	70,0	90,0	80,0	76,7	**90,0**
	RP,%	**79,3**	**35,7**	**26,7**	**38,5**	**20,7**	**10,7**	**9,5**	0,0	0,0	0,0	0,0
	DLP, %	20,7	**66,7**	73,3	66,7	80,0	90,3	90,3	100,0	100,0	100,0	100,0
	LMPZ11, cm	7,0	4,7	4,2	5,4	4,2	3,6	3,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciuluc	**RG,%**	96,7	93,3	100	93,3	96,7	100	96,7	100,0	100,0	100,0	**100,0**
	RP,%	**89,7**	**79,3**	**93,1**	**92,9**	**93,1**	**86,7**	**73,3**	**33,3**	**13,3**	0,0	0,0
	DLP, %	13,3	23,3	10,0	13,3	10,0	13,3	**26,7**	**66,7**	86,7	90,0	100,0
	LMPZ11, cm	9,0	7,46	8,1	8,1	6,9	5,6	5,4	4,1	3,9	0,0	0,0
Strălucitor	**RG,%**	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	96,7	100,0	100,0	100,0	93,3	**100,0**
	RP,%	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**96,5**	**76,7**	**46,7**	**20,0**	**28,6**	0,0
	DLP, %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	**23,3**	**53,3**	80,0	73,3	100,0
	LMPZ11, cm	9,1	8,4	8,8	7,8	7,4	5,4	5,1	4,2	3,6	3,9	0,0
SxI-9B	**RG,%**	96,7	100,0	96,7	93,3	80,0	100,0	90,0	90,0	93,3	93,3	**86,7**
	RP,%	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**81,5**	**0,00**	**69,2**	**18,7**	**29,6**	**11,5**
	DLP, %	3,3	6,7	16,7	6,7	10,0	**23,3**	**73,3**	83,3	100,0	100,0	100,0
	LMPZ11, cm	10,9	9,4	7,0	6,9	6,8	5,4	0,0	5,0	3,9	3,8	3,7
CxI-5As	**RG,%**	100,0	100,0	90,0	93,3	96,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	**100,0**
	RP,%	**96,7**	**93,3**	**92,6**	**100,0**	**93,1**	**76,7**	**26,7**	**16,7**	0,0	0,0	0,0
	DLP, %	3,3	0,0	3,3	6,7	20,0	**26,7**	100,0	40,0	90,0	73,3	90,0
	LMPZ11, cm	12,5	9,2	8,8	8,9	7,1	5,1	4,6	3,9	0,0	0,0	0,0

De asemenea, s-a evidențiat că indicele RP a corelat negativ cu creșterea treptată a dozei de radiație doar pentru s. Igri, unde valorile au scăzut de la 2,2 până la 8,3 ori (150-350 Gy) în comparație cu varianta martor. La soiurile Ciuluc, Strălucitor și formele hibride *CxI-5As*, *SxI-9B* s-a atestat reducerea graduală a acestui parametru doar pentru dozele 300-450 Gy, iar pentru dozele de 150-250 Gy, RP a constituit – 79,3-93,1% (s. Ciuluc), 93,1-100% (*CxI-5As*) și 100% (s. Strălucitor, *SxI-9B*) (Tabelul 1). Prin urmare, s. Strălucitor și linia hibridă *SxI-9B* prezintă toleranță înaltă la acțiunea razelor X (150-250 Gy), la etapa de plantulă, în comparație cu celelalte genotipuri.

Ulterior, în baza RP a fost calculată DLP 30, 50 și s-au stabilit dozele optime mutagene care au variat de la 150-400 Gy în dependență de genotipul evaluat. Astfel, pentru s. Igri, doza optimă este cea de 150 Gy (DLP 66,7%); pentru s. Ciuluc (DLP 26,7; 66,7%) și s. Strălucitor (DLP 23,3; 53,3%) – 350-400Gy, iar pentru liniile hibride *CxI-5As* și *SxI-9B* dozele de 300-400 (DLP 23,3; 73,3% și respectiv, DLP 26,7%) (Tabelul 1). Este necesar de menționat că, dozele optime stabilite în baza indecelui RP, coincid cu cele relatate de alți cercetători pentru semințele de orz iradiate cu raze gama (150-400 Gy) și nu sunt în concordanță cu dozele estimate pentru razele X (60-200 Gy) [6,7]. Cele menționate confirmă importanța estimării indicilor LMPZ11, RC 30, 50 recomandați anterior și de a determina dozele optime mutagene ale razelor X în dependență de soiul de plante, tipul și stadiul de dezvoltare a materialului biologic în care este măsurată stabilită letalitatea. Prin urmare, în rezultatul estimării LMP în faza Z11 obținute din boabele iradiate cu raze X, s-a evidențiat scăderea graduală a indicelui în dependență de doza radiației la toate genotipurile de orz evaluate, în comparație cu varianta martor (Tabelul 1).

De remarcat că în dependență de sensibilitatea genotipului, s-a evidențiat creșterea numărului de plantule în fazele de vegetație Z7-10 (Faza de apariție a coleoptilului), care ulterior rămân blocate în această fază. Astfel, pentru s. Igri, numărul de plantule în faza de coleoptil a constituit valori înalte la dozele 150-300 Gy (64,3-90,5%) și la doza 400 Gy – 100 %, iar la celelalte genotipuri analizate, la doza de 300 Gy. Aceasta ne-a determinat să calculăm indicele RC 30, 50 în baza LMP Z 7-11 și estimarea diferenței dintre variantele experimentale și martor, exprimată ca procent din varianta control. Diferența LMP Z 7-11 în variantele iradiate exprimate ca procent din varianta martor a constituit 49,92% pentru doza de 150 Gy la s. Igri, 48,96-61,60% pentru dozele de 300-350 Gy la s. Strălucitor și s. Ciuluc, și 55,10-73,85% pentru dozele 200-250 Gy la formele hibride *SxI-9 și CxI-5As*, ceea ce corespunde cu RC 30, 50% (Figura 2).

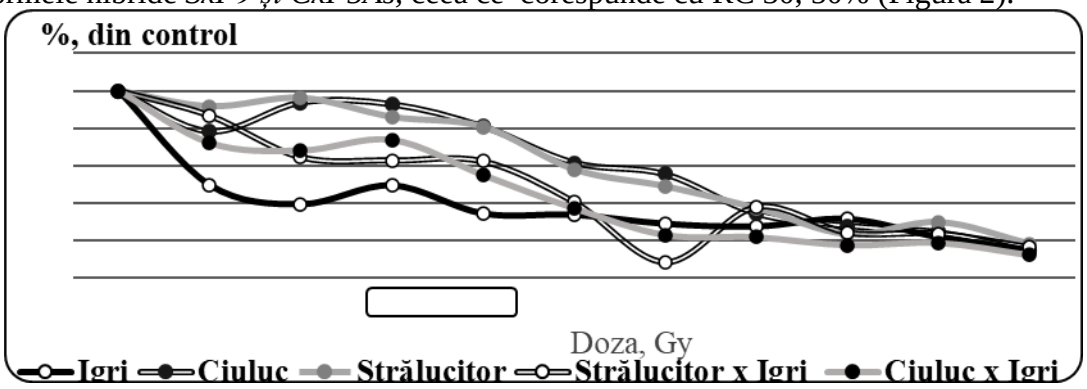


Figura 2. Reprezentarea grafică a curbelor radiosensibilității a 3 genotipuri și 2 linii hibride de orz de toamnă în baza lungimii medii a plantulelor în faza Z7-11 (varianta control = 100%)

În plus, analiza datelor experimentale prin aplicarea testului ANOVA denotă că genotipul, dozele aplicate ale razelor X și interacțiunea lor au influențat semnificativ (la nivel de 99,9%) asupra indicelui de creștere a plantulelor în baza LMPZ7-11 la orzul de toamnă (Tabelul 2). Acțiune maximă a manifestat dozele de radiație (PI=37,56%) indicând despre impactul major al dozelor de iradiere cu raze X asupra LMPZ7-11.

Tabelul 2

Analiza variantei a lungimii plantulelor în faza Z 7-11 la orzul de toamnă obținute din semințe iradiate cu raze X în 10 doze (ANOVA)

Sursa variației	GL	SP	F	PI,%
Genotip	4	915,047	23,96***	7,40
Doza radiației	10	4641,62	48,61***	37,56
Genotip x Doza radiației	40	1024,26	2,68***	8,29
Rezidual	605	5776,86		
Total	659	12357,8		

*** - diferența semnificativă pentru P ≤ 0,001; SP – suma pătratică; GL– grad de libertate; F – test Fisher

În rezultatul evaluării curbelor de radiosensibilitate, luându-se în considerare reacția specifică de genotip și de doza razelor X au fost selectate dozele optime mutagene de 200-250 Gy. Rezultate asemănătoare au fost obținute prin testarea radiosensibilității orzului de primăvară și orzului golaș la acțiunea razelor gama, unde au fost stabilite dozele de 210-253 Gy [3, 4].

Concluzii

În rezultatul analizei comparative a fost demonstrat impactul semnificativ al razelor X asupra indicilor de creștere a plantulelor la trei soiuri și două linii hibride de orz de toamnă și selectate dozele optime mutagene, dozele 200-250 Gy.

În scopul selectării eficiente a dozelor optime mutagene la orzul de toamnă se recomandă estimarea indicilor: rata plantulelor în stadiul Z11, lungimea medie a plantulelor în stadiu Z11 și Z7-11; reducerea creșterii cu 30, 50% (RC 30, 50) în baza LMPZ7-11 și doza letală a 30%, 50% la etapa de plantulă (DLP 30, 50).

Rezultatele obținute confirmă importanța efectuării testului de radiosensibilitate în dependență de genotipurile implicate în cercetare și a evaluării acțiunii razelor X la diferite stadii de dezvoltare a plantulelor de orz de toamnă în condiții de laborator, în cutii Petri.

Notă. Cercetările au fost realizate în cadrul subprogramului 011101 „*Abordări genetice și biotehnologice de management al agroecosistemelor în condițiile schimbărilor climatice*”, finanțat de către Ministerul Educației și Cercetării al RM.

Referințe bibliografice

1. Álvarez-Holguína., A, Morales-Nietob., R., et al. Mean lethal dose (LD50) and growth reduction (GR50) due to gamma radiation in Wilman lovegrass (Eragrostis super-ba). In: *Rev Mex CiencPecu*., 2019, vol. 10, no.1, p. 227-238. DOI:10.22319/rmcp.v10i1.4327
2. Chakraborty, S., Mahapatra, S., et al. Determination of Median Lethal (LD50) and Growth Reduction (GR50) Dose of Gamma Irradiation for Induced Mutation in Wheat. In: *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2023, vol.66., p.1-10. DOI: 10.1590/1678-4324-2023220294.
3. Ergün, N, Akdoğan, G. et al. Determination of optimum gamma ray irradiation doses for hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum* L. Hook. f.) genotypes. In: *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*. 2023, vol 33, no.2, p. 219-230. DOI: https://doi.org/10.29133/yyutbd.1248710
4. Glogovac, S., Trkulja, D., et al. Determination of the optimal doses of gamma irradiation for induced mutation in wheat and barley. In: *Ratarstvo i povrtarstvo*. 2024, no. 1, p. 1-8. DOI: https://doi.org/10.5937/ratpov61-48887
5. Ghosh, S., Ganga, M. Induction of mutation in Jasminum grandiflorum with gamma rays and EMS and identification of novel mutants using molecular markers and SEM imaging. In: *Indi-an Journal of Horticulture*. 2020, Vol. 77, no. 4, 695 pp. DOI:10.5958/0974-0112.2020.00101.2
6. Spencer-Lopes, M. M., Forster, B. P., et al. Manual on Mutation Breeding (3rd ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2018, 301 pp.
7. Suprasanna, P., Mirajkar, S.J. et al. Induced mutations and crop improvement. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L. & Krishnamurthy K. (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. 2015, vol.23 p. 593-616.
8. Protocol for X-ray mutagenesis of plant material: seed. https://www.iaea.org/sites/default/files/21/07/nafa-pbg-manual-protocol-x-ray-mutagenesis-plants.pdf
9. http://mvd.iaea.org/, vizitat 08.02.2024.