

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIETII „REGELE
MIHAI I" DIN TIMIȘOARA**

Scoala Doctorală Ingineria resurselor vegetale si animale

Ing. ONISAN GRIGORE EMILIAN

TEZA DE DOCTORAT



**Coordonator Științific:
Prof. Dr. Botău Dorica**

TIMISOARA 2023

Rezumat

Cuvinte cheie: floarea-soarelui, ameliorare, androsterilitate citoplasmatica, gene de restaurare, citotoxicitate salina, vacuolizare, salvarea embrionilor imaturi, *in vitro*, *in vivo*, specii salbatice, *Plasmopara halstedii*, *Orobanche cumana*.

Ameliorarea florii-soarelui se confruntă cu o serie de provocări care încetinesc considerabil procesul de creare al hibridilor. Printre acestea sunt numărul mare de generații necesare în crearea liniilor consangvinizate și prezența factorilor patogeni cum sunt, speciile parazitare *Plasmopara halstedii* (cu peste 40 de nomenclaturi) și *Orobanche cumana*. Selecția complexă a genotipurilor rezistente și productive este îndelungată și necesită introducerea unor metode rapide pentru reducerea numărului de generații. Aceste provocări au fost abordate în cadrul tezei de doctorat intitulată "UTILIZAREA BIOTEHNOLOGIEI ÎN AMELIORARE LA FLOAREA SOARELUI", unde s-au optimizat metode de selecție și s-a evaluat posibilitatea utilizării genotipurilor B create pe citoplasmă androsterila cu gene de restaurare.

În cadrul cercetărilor s-a urmărit optimizarea unei metode de salvare a embrionilor imaturi, atât în condiții *in vitro*, cât și *in vivo*, s-au evaluat unele populații interspecifice de floarea-soarelui pentru obținerea genotipurilor rezistente la *Orobanche cumana* și *Plasmopara halstedii*. Rezultatele obținute contribuie la eficientizarea programelor de ameliorare a florii-soarelui prin reducerea numărului de generații, a numărului de forme parentale, eficientizarea selecției prin analizarea citologică a genotipurilor de floarea-soarelui și obținerea rezistenței la *Plasmopara halstedii* și *Orobanche cumana* prin introgresia genelor de rezistență stabilizate în genotipurile derivate din populațiile interspecifice.

Teza cuprinde 2 parti:

A. Stadiul actual al cercetărilor privind ameliorarea la floarea-soarelui

Capitolul I. În această primă parte sunt prezentate stadiul actual al cercetărilor, metodele actuale utilizate pentru îmbunătățirea ameliorării florii-soarelui și rezistenței la speciile parazite ale acestora.

B. CERCETĂRI PROPRII

Capitolul II. În acest capitol ne-am propus să analizăm și să optimizăm posibilitățile utilizării unor metode de ameliorare la floarea-soarelui.

Obiectivele urmărite în acest capitol au fost:

A. Exploatarea androsterilității citoplasmatică (PET1) și a genelor de restaurare (Rf_1), în vederea creării liniei consangvinizate B pe citoplasma sterilă (PET1) cu gene restauratoare heterozigote (Rf_1rf_1).

B. Utilizarea diagnosticului citologic în selecția genotipurilor de floarea-soarelui pentru identificarea diferitelor modificări citologice asociate cu stresul salin, care pot constitui un punct de plecare în selecția genotipurilor tolerante de floarea-soarelui.

C. Crearea unui protocol eficient de salvare a embrionilor imaturi *in vivo* și *in vitro*, prin utilizarea soluțiilor și a mediilor de cultură suplimentate cu hormoni de creștere (BAP, NAA și GA₃).

Materialul biologic utilizat a fost:

A. Pentru exploatarea androsterilității citoplasmatică și a genelor de restaurare a fost utilizată linia B (N- rf_1rf_1) AG1001B, linia A (PET1- rf_1rf_1) AG1001A și linia Rf AG121R (PET1- Rf_1Rf_1) furnizate de AGHELIA SEED.

Pentru a crea linia B (PET1-Rf₁rf₁) am utilizat ca parinti nerecurenti genotipurile sterile (CMS) si linia Rf ca părinte recurent.

B. Pentru analizele citologice ale stresului salin la nivelul tesutului meristematic de *Helianthus annuus* (2n=34), s-a ales linia consangvinizată HA-89.

C. Pentru optimizarea metodei biothenologice de salvare a embrionilor imaturi, am utilizat noile genotipuri create din încrucișările CMS HA89 X RHA-419 (G1-hibrid) și HA-89 X HA-BR4 (G2-BxB), în condiții de câmp din Timișoara. Genotipurile noi obținute G1 si G2 au fost utilizate pentru determinarea procentului de salvare a embrionilor imaturi atât în generația F₁, cât și în generația F₂.

Metodele de cercetare utilizate au fost:

A. Pentru crearea liniei B -PET1-Rf₁rf₁ s-au efectuat retroincrușișări succesive (BC_n). In generatia F₁ plantele CMS ale analogului B au fost incrucisate cu parintele recurent Rf. Descendentii rezultati din generatia F₁ au fost utilizati ca parinti recurenti si au fost retroincrucisati cu formele CMS ale analogului B. Procesul a continuat pana la completa stabilizare a liniei B -PET1-Rf₁rf₁.

B. Metoda de analiza citologică a implicat utilizarea tratamentelor cu diferite concentratii de sare. Analizele citologice au inclus determinarea indicelui mitotic (IM), indicelui de aberații cromozomiale (IAC), indicelui de provacuolar (IPV) si a indicelui de vacuolizare (IV).

C. Pentru salvarea embrionilor imaturi, recoltarea acestora a fost realizata la 5 si 12 zile dupa inflorire, utilizandu-se pentru fiecare tratament 100 de embrioni. In conditiile *in vitro* si *in vivo*, dupa fecundare, embrionii imaturi recoltati s-au sterilizat cu soluție de clorură mercurică (HgCl₂) 0.2%. Balanta hormonoala pentru tratmentele *in vitro* analizate au fost T1 MS₀, T2 (MS+ BAP 2 mg/l), T3 (MS + NAA 2 mg/l +BAP 1 mg/l), T4 (MS+ GA₃ 2 mg/l). In conditiile *in vivo* am utilizat urmatoarele tratamentele au fost T1 (H₂O), T2 (MS₀), T3 (APA + GA₃ 2 mg/l) si T4 (MS + GA₃ 2 mg/l).

Pentru stabilirea celor mai bune condiții de aclimatizare s-au analizat procentele de supraviețuire ale plantulelor în diferite conditii (cu sau fara stimulator de crestere, cu sau fara expunere la mediul extern). Pentru interpretarea rezultatelor privind diferențele de salvarea a embrionilor imaturi am utilizat testul ANOVA (analiza variantei bifactorila si trifactoriala) si testul Tukey pentru compararea mediilor.

Rezultate si discutii

A. Exploatarea androsterilității citoplasmatică și a genelor de restaurare pentru dezvoltarea hibridilor de floarea-soarelui. Conform rezultatelor, din procesul de creare a liniilor consangvinizate B-PET1-Rf₁rf₁, in generația F₁ s-a obtinut un număr maxim de plante fertile. În generația F₁BC₁ s-a obținut un procent de plante fertile și sterile în raport de 1:1 ($\chi^2=0,90$). Același raport poate fi observat și în generația F₁BC₂-F₁BC₄. La prima autopolenizare (F₂BC₄) a descendenților heterozigoți s-a observat un raport de plante fertile și sterile de 3:1 ($\chi^2=1,06$), fiind confirmat conceptul de formare a liniilor consangvinizate de tipul B-PET1-Rf₁rf₁. Conservarea liniei B-PET1-Rf₁rf₁ se face obligatoriu prin menținerea stării alelice heterozigote a genelor Rf₁. Metoda de menținere a noilor linii consangvinizate poate fi o combinatie de autopolenizare și polenizare de tip SIB, poate fi doar polenizare de tip SIB sau poate fi doar autopolenizare. Pentru a crea hibridii F₁ au fost utilizate genotipurile androsterile obținute ca urmare a segregării genei Rf₁ în procesului de menținere a liniilor consangvinizate B-PET1-Rf₁rf₁. Genotipurile

androsterile au fost încrucișate cu linia consangvinizată Rf pentru obținerea hibridilor. Rezultatele au arătat că toți descendenții rezultați din aceste încrucișări au fost fertili, ceea ce reflecta posibilitatea integrării liniilor consangvinizate B-PET1-Rf₁r_f1 în programele de ameliorare.

B. Evaluarea posibilităților de utilizare a diagnosticului citologic în selecția genotipurilor. Pe baza analizelor citologice se constată că efectul stresului salin asupra fenomenului de vacuolizare devine tot mai evident pe măsură ce timpul de expunere crește și concentrația de sare este mai mare ($p < 0.001$). Creșterea semnificativă a indicelui provocuolar și a indicelui de vacuolizare se datorează acumulării de NaCl₂ în celula. Prezența nucleilor în celule vacuolarizate demonstrează faptul că celulele nu sunt în diviziune, acestea prezentând o vacuolă marită cu materialul genetic distribuit uniform în jurul lor. Provacuolele fuzionează provocând vacuolizarea celulelor sub efectul stresului salin. S-a observat o creștere a indicelui de vacuolizare concomitent cu scăderea indicelui mitotic în condiții de stres salin.

C. Salvarea embrionilor imaturi de floarea-soarelui în condițiile *in vitro*. Conform analizelor, procentul de salvare a embrionilor imaturi este influențat de tratamentul hormonal utilizat în condiții *in vitro* și nu de genotipul sau generația acestuia. Cele mai bune rezultate fiind obținute pe mediul MS suplimentat cu hormoni GA₃ (T₄, 2mg/l), unde s-a observat o creștere semnificativă a procentului de embrioni imaturi salvați la 12 zile în condiții *in vitro* în comparație cu tratamentul martor (MS₀). Perioadele de recoltare de 5 zile și 12 zile influențează procentul de salvare a embrionilor imaturi într-un mod semnificativ. Influența hormonilor asupra vârstei embrionilor imaturi are un rol important în creșterea procentului de salvare al acestora. Cele mai bune rezultate în supraviețuirea embrionilor imaturi recoltați la 5 zile după înflorire s-au obținut utilizând NAA și BAP. La embrioni imaturi recoltați la 12 zile de la înflorire, procentele cele mai mari de salvare a embrionilor imaturi se regăsesc pe mediul MS suplimentat cu hormoni GA₃.

În condițiile *in vivo*, procentul de embrioni imaturi salvați prezintă o diferență semnificativă între soluțiile utilizate. Cele mai bune rezultate s-au înregistrat în condițiile utilizării soluției MS și MS suplimentat cu hormoni cu GA₃.

Capitolul III. În acest capitol am testat genotipurile derivate din populațiile interspecifice de floarea-soarelui în privința rezistenței la speciile parazitare *Orobanche cumana* și *Plasmopara halstedii*. S-au urmărit două obiective:

A. Crearea și testarea genotipurilor rezistente la rasele 730 și 714 de *Plasmopara halstedii*;

B. Crearea și testarea genotipurilor rezistente la rasa E de *Orobanche cumana*;

Cele două obiective s-au realizat prin următoarele activități:

- evaluarea conținutului de ulei și a cantității de semințe (MMB) la liniile create din populațiile interspecifice de floarea-soarelui;
- identificarea genelor dominante prin analiza rapoartelor de segregare la *Plasmopara halstedii*;
- identificarea și conservarea genotipurilor cu rezistență la *Orobanche cumana* și *Plasmopara halstedii*;
- analiza variației suprafeței foliare și radiculare în condiții normale pentru genotipul hibrid și liniile consangvinizate pentru optimizarea testelor;

- compararea genotipurilor rezistente cu cele sensibile și caracterizarea fenomenelor de rezistență și sensibilitate la *Orobanche cumana*;

- evaluarea liniilor consangvinizate nou create AH1538 (*H. giganteus*) și AH1104 (*H. divaricatus*).

Material biologic utilizat în procesul de creare a liniilor consangvinizate rezistente la *Plasmopara halstedii* și *Orobanche cumana* am utilizat genotipuri din speciile sălbatice de floarea-soarelui și anume: *H. salicifolia*, *H. strumosus*, *H. maximiliani*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. hirsutus*, *H. H. nuttallii* și *H. occidentalis*.

Metoda de cercetare utilizată au fost:

A. Evaluarea rezistenței la *Plasmopara halstedii* am utilizat rasa 730 și rasa 714 ce sunt printre cele mai întâlnite în prezent în culturile de floarea-soarelui.

B. Evaluarea la *Orobanche cumana* s-a efectuat atât în câmp cât și în rizotronul automat. Evaluarea în câmp s-a realizat în zonele cu infestare naturală de *Orobanche cumana* de la Szeged, în 3 repetiții, cu 4 rânduri/repetiție într-un bloc randomizat.

Rezultate și discuții

A. Privind toleranța la rasele 730 și 714 de *Plasmopara halstedii*. În urma analizei liniilor consangvinizate de floarea-soarelui create din populațiile interspecifice s-au remarcat următoarele linii consangvinizate:

-la *H. divaricatus*: 2 linii cu rezistență heterozigotă (E0001 și E0002) și o linie cu rezistență homozigotă (E0003);

-la *H. giganteus*: 2 linii cu rezistență heterozigotă (E0004 și E0006); *H. hirsutus*: 4 linii cu rezistență heterozigotă (E0008, E0011, E0012, E0013);

-la *H. hirsutus*: 4 linii cu rezistență heterozigotă (E0008, E0011, E0012, E0013);

-la *H. maximiliani*: 8 linii cu rezistență heterozigotă (E0020, E0023, E0026, E0029, E0030, E0032, E0035, E0036, E0037) și o linie cu rezistență homozigotă (E0023);

-la *H. H. nuttallii* : (E0038, E0039, E0040);

- *H. occidentalis*: o linie cu rezistență heterozigotă (E0045); *H. salicifolia*: o linie cu rezistență homozigotă (E0046);

-la *H. occidentalis*: linia AH1223 cu rezistență heterozigotă (E0045);

-la *H. strumosus*: două linii cu rezistență heterozigotă (E0047 și E0049) și o linie cu rezistență homozigotă (E0048).

Privind rezistența la parazitul *Orobanche cumana* rasa E în condiții de câmp, testele efectuate pe genotipurile create confirmă faptul că liniile AH1102 și AH1104, derivate din *H. divaricatus*, liniile consangvinizate AH1537 și AH1538, derivate din *H. giganteus* oferă rezistență homozigotă la rasa E. Liniile consangvinizate provenite din speciile sălbatice *H. hirsutus*, *H. maximiliani*, *H. H. nuttallii*, *H. occidentalis*, *H. salicifolia* și *H. strumosus* nu au prezentat rezistență la rasa E de *Orobanche cumana*.

Prin compararea tuturor factorilor luați în studiu observăm că genotipul sensibil la *Orobanche cumana* se caracterizează prin:

- o diminuare semnificativă a suprafeței foliare începând cu ziua 30;

- o inhibare a creșterii suprafeței radiculare și foliare în perioada 20-40 de zile;

- formarea nodulilor de *Orobanche cumana* dupa perioada curpinsa intre 20-30 de zile;
- dupa o perioada de 20-80 de zile se inregistreaza o diminuarea semnificativa a suprafetei foliare si radiculare pana la disparitia completa a plantelor de floarea-soarelui;
- absenta perioadei de inflorire;
- Genotipurile rezistente la *Orobanche cumana* se caracterizează prin următoarele aspecte:
 - creșterea continuă a suprafetei foliare și radiculare in perioada 20-40 de zile;
 - absența nodulilor radiculari de *Orobanche cumana*
 - prezenta etapei de inflorire.

Toate aceste caracteristici sunt prezente la liniile consangvinizate AH1538 si AH1104, create din specia *H. giganteus* si *H.divaricatus*, în cadrul tezei de doctorat.

CONCLUZII GENERALE SI RECOMANDARI

- I. Metoda de obtinere a liniei consangvinizate B-PET1-Rf₁rf₁ de mentinerea ei si de producere a hibrizilor.**
- linia consangvinizata B-PET1-Rf₁rf₁ a fost analizată pe mai multe generații, înregistrând rezultatele de segregare ale genei Rf₁ care s-au armonizat cu valorile teoretice, validând astfel metoda de creare a liniilor consangvinizate de tipul B-PET1-Rf₁rf₁;
 - metoda de menținere a liniei consangvinizate B-PET1-Rf₁rf₁ a fost validată atât prin autopolenizare, cât și prin polenizare (SIB), reușind să mentina raportului de segregare al genei Rf₁ în raport normal de 3:1 și, respectiv, 1:1 în cazul polenizării SIB;
 - metoda de creare a hibrizilor prin utilizarea liniei consangvinizate B-PET1-Rf₁rf₁ a fost posibilă datorită utilizării formelor CMS rezultate în urma segregării genelor Rf₁. Hibrizii rezultați au fost fertili în încrucișările cu formele parentale RHA, validând astfel acest proces.

II. Evaluarea posibilitatilor de utilizare a diagnosticului citologic în selecția genotipurilor tolerante la NaCl₂

- în urma analizelor citologice la *Helianthus annuus* L., s-a evidențiat efectul citotoxic al soluțiilor saline, manifestat prin fenomenul de vacuolizare. Celulele vacuolizate prezintă materialului genetic distribuit uniform sau neuniform în jurul vacuolei. Prezența nucleolilor confirmă faptul că celulele vacuolizate nu se află în diviziune, numărul lor crescand în funcție de concentrația soluției saline și de durata expunerii. Fenomenul de vacuolizare al celulelor reprezintă un indicator important pentru determinarea citotoxicității celulare la floarea-soarelui, în cazul expunerii la stresul salin. Identificarea unui indice de vacuolizare redus si scăderea indicelui mitotic au condus la crearea unei metode facile de selecție a genotipurilor de floarea-soarelui tolerante la stresul salin.

III. Efectul tratamentelor asupra genotipurilor, generatiilor si perioadelor de recoltare asupra ratei de salvare a embrionilor imaturii in conditii *in vitro*

- aplicarea hormonilor in procesul de salvare a embrionilor imaturi este esentiala in functie de perioada de recoltare a embrionilor imaturi. Factorul ce influențează puternic creșterea procentului de embrioni imaturi salvați este tipul tratamentului și nu genotipurile sau generațiile utilizate. Conform rezultatelor, cele mai mari valori procentuale au fost obținute pe mediul MS suplimentat cu hormoni GA₃, urmat de mediul MS suplimentat cu hormoni NAA și

BAP. Hormonii NAA și BAP au stimulat creșterea procentului de salvare a embrionilor imaturi recoltați după 5 zile de la înflorit. Perioada de recoltare a embrionilor imaturi este foarte importantă pentru creșterea procentului de salvare a acestora. Valori procentuale semnificative mai mari au fost obținute la embrionii recoltați la 12 zile comparativ cu cei recoltați la 5 zile după fecundare.

IV. Procentul de salvare al embrionilor imaturi în condiții *in vivo*

- utilizarea soluției nutritive MS₀ și a MS suplimentat cu GA₃ a favorizat o creștere a numărului de embrioni salvați în comparație cu martorul (T1-H₂O), ceea ce a demonstrat necesitatea utilizării mediilor nutritive în procesul de salvare a embrionilor imaturi.

V. Adaptarea plantelor derivate din embrionii imaturi salvați în perioada de aclimatizare

- cele mai mari valori de adaptare a plantelor derivate din embrioni imaturi s-au înregistrat atunci când s-au utilizat biostimulatorii și protecție împotriva mediului exterior sau o combinație a acestora (C4 - protecție + biostimulator), față de varianta martor C1 (fără protecție, fără biostimulator).

VI. Utilizarea populațiilor interspecifice de floarea-soarelui pentru obținerea genotipurilor rezistente la *Plasmopara halstedii* 730 și 714

- liniile consanguinizate create din populațiile interspecifice pot fi utilizate cu succes în obținerea rezistenței la rasele cele mai comune de *Plasmopara halstedii*, rezistența homozigotă fiind prezentă la genotipurile: E0003 (*H. divaricatus*), E0023 (*H. maximiliani*), E0046 (*H. salicifolia*) și E0048 (*H. strumosus*).

VII. Utilizarea populațiilor interspecifice de floarea-soarelui pentru obținerea genotipurilor rezistente la *Orobanche cumana* rasa E

- testările efectuate pe genotipurile create confirmă faptul că liniile AH1102 și AH1104, derivate din *H. divaricatus*, și liniile consanguinizate AH1537 și AH1538, derivate din *H. giganteus*, oferă o rezistență homozigotă la rasa E;
- liniile consanguinizate provenite din speciile sălbatice *H. hirsutus*, *H. maximiliani*, *H. H. nuttallii*, *H. occidentalis*, *H. salicifolia* și *H. strumosus* nu au prezentat rezistență la rasa E de *Orobanche cumana*.

VIII. Acțiunea parazitului *Orobanche cumana* asupra genotipurilor rezistente și sensibile

- rezultatele obținute cu ajutorul rizotronului automat au reliefat faptul că genotipul rezistent prezintă o creștere similară cu genotipul sensibil, în ce privește suprafața foliară și radiculară, în primele 20 de zile în condițiile normale și de infestare. Genotipul rezistent a reușit să limiteze efectele negative cauzate de parazitul *Orobanche cumana* în condițiile de infestare acestea ajungând la perioada de înflorit;

- în urma analizelor observăm că genotipul sensibil la *Orobanche cumana* se caracterizează printr-o diminuare semnificativă a suprafeței foliare și radiculare și inhibare a ratei de creștere. Sensibilitatea plantelor a determinat formarea nodulilor de *Orobanche cumana* și o diminuare semnificativă a suprafeței foliare și radiculare până la dispariția completă a plantelor. Genotipurile rezistente la parazitul *Orobanche cumana* s-au caracterizat printr-o creștere continuă a suprafeței foliare și radiculare, absența nodulilor radiculari și prezenta etapei de înflorire.

Pe baza rezultatelor noastre recomandăm următoarele:

- utilizarea liniilor consangvinizate de tipul B-PET1-Rf₁r_f₁ trebuie efectuată conform modelelor genetice create, monitorizând rapoartele normale de segregare ale genei Rf₁. Este important ca raportul de menținere a liniilor consangvinizate să rămână la 3:1 în autopolenizare și 1:1 în polenizare SIB sau BC. Opțional, pentru identificarea genelor Rf₁ se recomandă utilizarea markerilor moleculari;
- utilizarea diagnosticului citologic în selecția genotipurilor de floarea-soarelui poate fi realizată prin monitorizarea indicelui de vacuolizare ca efect al citotoxicității stresului salin. Se recomandă monitorizarea genotipurilor cu un indice semnificativ ($p < \alpha$) de vacuolizare mai mic decât al martorului;
- în ceea ce privește utilizarea culturilor *in vitro*, se recomandă recoltarea embrionilor imaturi la 12 zile de la înflorire și cultivarea lor pe mediul MS suplimentate cu hormonul GA₃. Mai economic, se poate opta și pentru utilizarea culturilor *in vivo*, însă numărul de embrioni recoltați trebuie să fie suficient de mare pentru a obține numărul de plante dorit ce vor parcurge etapa de aclimatizare;
- se recomandă utilizarea populațiilor interspecifice provenite din speciile salbatice de *H. divaricatus* și *H. giganteus* în dezvoltarea genotipurilor de floarea-soarelui, speciile salbatice oferind o rezistență atât la parazitul *Orobanche cumana* cât și la *Plasmopara halstedii*;
- în selecția genotipurilor rezistente la *Orobanche cumana* se recomandă monitorizarea prezenței sau absenței nodulilor radiculari, monitorizarea perioadei de înflorire și menținerea unei rate normale de creștere în intervalul de 20-80 de zile, în comparație cu genotipurile sensibile.

ELEMENTELE DE ORIGINALITATE ALE CERCETĂRIILOR ȘI PERSPECTIVE.

Cercetările din cadrul demersului științific prezentat în teza de doctorat intitulată "UTILIZAREA BIOTEHNOLOGIEI ÎN AMELIORAREA LA FLOAREA-SOARELUI" au adus contribuții la rezolvarea unor probleme din programele de ameliorare a florei-soarelui:

Linia consangvinizată de tip B-PET1-Rf₁r_f₁ creată reprezintă un material biologic inovator care contribuie la eficientizarea programelor de ameliorare prin reducerea numărului de forme parentale de la 3 la 2.

Prin introducerea liniei consangvinizate de tipul B-PET1-Rf₁r_f₁, amelioratorii de floarea-soarelui vor câștiga flexibilitate și dinamică în procesul de ameliorare, având posibilitatea să opteze pentru menținerea acestui genotip prin autopolenizare, polenizare SIB, sau o combinație între autopolenizare și polenizare SIB.

Utilizarea diagnosticului citologic privind indicele de vacuolizare în selecția genotipurilor de floarea-soarelui permite identificarea rapidă a genotipurilor cu toleranță sporită la stresul salin, oferind programelor de ameliorare o metodă eficientă de selecție.

Suplimentarea mediului de cultură și a soluțiilor nutritive cu GA₃ în procesul de salvare a embrionilor imaturi, atât în condiții *in vitro*, cât și *in vivo*, a condus la o eficiență crescută în supraviețuirea embrionilor imaturi. Stabilirea clară a perioadei de recoltare și a condițiilor de cultivare în procesul de salvare a embrionilor imaturi optimizează eficient metoda rapidă de obținere a unui număr mare de generații într-un timp scurt.

Genotipurile de floarea-soarelui nou create AH1538 și AH1104, derivate din speciile sălbatice de *Helinathus* vor oferi noi posibilități de contracarare a efectului negativ cauzat de parazitul *Orobanche cumana*. În cadrul cercetărilor s-au creat genotipuri de floarea-soarelui cu rezistență homozigotă la rasele cele mai comune de *Plasmopara halstedii* (730 și 714) și anume, liniile E0003 (*H. divaricatus*), E0023 (*H. maximiliani*), E0046 (*H. salicifoli*) și linia consanguinizată E0048 (*H. strumosus*).

Rezultatele privind identificarea modului de acțiune a parazitului *Orobanche cumana* în rizotronul automat, precum și identificarea elementelor de sensibilitate și rezistență la acest parazit, vor permite o selecție mai eficientă a genotipurilor de floarea-soarelui derivate din speciile sălbatice. Rapiditatea înregistrării acestor elemente în anumite perioade de creștere a plantelor asigură optimizarea selecției rapide a genotipurilor valoroase.

În perspectiva, continuarea cercetărilor privind utilizarea și evaluarea populațiilor interspecifice furnizează surse importante de rezistență în programele de ameliorare la floarea-soarelui. Materialul biologic creat și optimizarea metodelor de obținere a lui oferă noi oportunități de ameliorare și contribuie la îmbunătățirea programelor de ameliorare.

**UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES" KING OF ROMANIA
MIHAI I" FROM TIMISOARA**

Doctoral School of Plant and Animal Resources Engineering

Ing. ONISAN GRIGORE EMILIAN



**USE OF BIOTECHNOLOGY IN SUNFLOWER
BREEDING**

Scientific Coordinator:
Prof. Dr. Botău Dorica

TIMISIOARA 2023

Summary

Keywords: *sunflower, breeding, cytoplasmic male sterility, restorer genes, salt cytotoxicity, vacuolization, immature embryo rescue, in vitro, in vivo, wild species, Plasmopara halstedii, Orobanche cumana.*

Sunflower breeding faces several challenges that considerably slow down the process of creating hybrids. Among these challenges are the large number of generations required to develop inbred lines and the presence of pathogenic factors, such as the parasitic species *Plasmopara halstedii* (with over 40 nomenclatures) and *Orobanche cumana*. The complex selection of resistant and productive genotypes is time-consuming and requires the introduction of rapid methods to reduce the number of generations. These challenges were addressed in the doctoral thesis entitled "THE USE OF BIOTECHNOLOGY IN SUNFLOWER BREEDING," where selection methods were optimized, and the possibility of using B genotypes created on cytoplasmic male sterility with restorer genes was evaluated.

The research aimed to optimize a method for rescuing immature embryos, both in vitro and in vivo. Interspecific populations of sunflower were evaluated for obtaining genotypes resistant to *Orobanche cumana* and *Plasmopara halstedii*. The results contribute to the efficiency of sunflower breeding programs by reducing the number of generations, the number of parental forms, improving selection through cytological analysis of sunflower genotypes, and obtaining resistance to *Plasmopara halstedii* and *Orobanche cumana* by introgressing stable resistance genes into genotypes derived from interspecific populations.

The thesis comprises two parts:

A. Current state of research on sunflower breeding

Chapter I. This first part presents the current state of research, the current methods used to improve sunflower breeding and resistance to its parasitic species.

B. OWN RESEARCH

Chapter II. In this chapter, we aimed to analyze and optimize the possibilities of using breeding methods in sunflower.

The objectives pursued in this chapter were:

A. Exploitation of cytoplasmic male sterility (PET1) and restorer genes (Rf1) to create the inbred line B on the sterile cytoplasm (PET1) with heterozygous restorative genes (Rf1rf1).

B. Use of cytological diagnosis in the selection of sunflower genotypes to identify different cytological changes associated with salt stress, which can be a starting point for selecting tolerant sunflower genotypes.

C. Establishing an efficient protocol for the rescue of immature embryos in vivo and in vitro, using culture media supplemented with growth hormones (BAP, NAA, and GA₃).

The biological material used was:

A. For the exploitation of cytoplasmic male sterility and restorer genes, the B line (N-rf1rf1) AG1001B, the A line (PET1-rf1rf1) AG1001A, and the Rf line AG121R (PET1-Rf₁Rf₁) provided by AGHELIA SEED were used. To create the B line (PET1-Rf1rf1), sterile (CMS) genotypes and the Rf line were used as non-recurrent parents.

B. For cytological analyses of salt stress at the level of meristematic tissue of *Helianthus annuus* ($2n=34$), the inbred line HA-89 was chosen.

C. For the optimization of the biothenological method for rescuing immature embryos, new genotypes created from CMS HA89 X RHA-419 (G1-hybrid) and HA-89 X HA-BR4 (G2-BxB) were used under field conditions in Timisoara. The newly obtained genotypes G1 and G2 were used to determine the percentage of rescued immature embryos in both the F1 and F2 generations.

The research methods used were:

A. For the creation of the B line -PET1-Rf1rf1, successive backcrosses (BC_n) were performed. In the F1 generation, CMS plants of the B analog were crossed with the recurrent parent Rf. The descendants resulting from the F1 generation were used as recurrent parents and were backcrossed with the CMS forms of the B analog. The process continued until the B-PET1-Rf1rf1 line was fully stabilized.

B. The cytological analysis method involved treatments with different concentrations of salt. Cytological analyses included the determination of the mitotic index (MI), the chromosomal aberration index (CAI), the provacuolar index (PVI), and the vacuolization index (VI).

C. For the rescue of immature embryos, the embryos were collected at 5 and 12 days after flowering, using 100 embryos for each treatment. In vitro and in vivo, after fertilization, the collected immature embryos were sterilized with a 0.2% mercuric chloride (HgCl₂) solution. Hormonal balance for the analyzed in vitro treatments was as follows: T1 MS0, T2 (MS+ BAP 2 mg/l), T3 (MS + NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l), T4 (MS + GA3 2 mg/l). Under in vivo conditions, the following treatments were used: T1 (H₂O), T2 (MS0), T3 (APA + GA3 2 mg/l), and T4 (MS + GA3 2 mg/l).

To establish the best acclimatization conditions, the survival percentages of seedlings were analyzed under different conditions (with or without growth stimulators, with or without exposure to the external environment). To interpret the results regarding the differences in immature embryo survival, ANOVA (bifactorial and trifactorial analysis of variance) and Tukey's test were used for mean comparison.

Results and discussions:

A. Exploiting cytoplasmic male sterility and restoration genes for sunflower hybrid development. According to the results, the process of creating consanguineous lines B-PET1-Rf1rf1 resulted in a maximum number of fertile plants in the F1 generation. The F1BC1 generation exhibited a 1:1 ratio of fertile to sterile plants ($\chi^2=0.90$). The same ratio was observed in the F1BC2-F1BC4 generations. In the first self-pollination (F2BC4) of heterozygous descendants, a 3:1 ratio of fertile to sterile plants was observed ($\chi^2=1.06$), confirming the formation of consanguineous lines of the B-PET1-Rf1rf1 type. The conservation of the B-PET1-Rf1rf1 line is mandatory by maintaining the heterozygous allelic state of the Rf1 genes. The method of maintaining the new consanguineous lines can be a combination of self-pollination and self-incompatible backcrossing (SIB) or just self-pollination. The F1 hybrids were created using androsterile genotypes resulting from the segregation of the Rf1 gene during the maintenance process of the B-PET1-Rf1rf1 consanguineous lines. The androsterile genotypes were crossed with the Rf consanguineous line to obtain the hybrids. The results showed that all descendants resulting from these crosses

were fertile, indicating the possibility of integrating the B-PET1-Rflrfl consanguineous lines into breeding programs.

B. Evaluation of the cytological diagnostic possibilities in genotype selection. Cytological analyses revealed that the effect of saline stress on the vacuolation phenomenon becomes more evident as the exposure time increases and the salt concentration is higher ($p < 0.001$). The significant increase in the provacuolar index and the vacuolation index is due to the accumulation of NaCl_2 in the cell. The presence of nuclei in vacuolated cells demonstrates that these cells are not in division, presenting an enlarged vacuole with the genetic material distributed uniformly around them. The fusion of provacuoles leads to cell vacuolation under saline stress. A significant increase in the vacuolation index was observed along with a decrease in the mitotic index under saline stress conditions.

C. *In vitro* immature embryo rescue of sunflower. According to the analyses, the percentage of immature embryo rescue is influenced by the hormonal treatment used *in vitro* and not by its genotype or generation. The best results were obtained on the MS medium supplemented with GA_3 hormone (T4, 2 mg/l), where a significant increase in the percentage of immature embryos saved at 12 days under *in vitro* conditions was observed compared to the control treatment (MS_0). The harvesting periods of 5 days and 12 days significantly influenced the percentage of immature embryo survival. The influence of hormones on the age of immature embryos plays an important role in increasing their survival rate. The best results in immature embryo survival at 5 days after flowering were obtained using NAA and BAP hormones. For immature embryos harvested at 12 days after flowering, the highest percentages of immature embryo survival were found on the MS medium supplemented with GA_3 hormone.

Under *in vivo* conditions, the percentage of immature embryos saved showed a significant difference between the solutions used. The best results were recorded under the conditions of using the MS solution and the MS supplemented with GA_3 hormone.

Chapter III. In this chapter, we tested the genotypes derived from interspecific populations of sunflower for resistance to parasitic species *Orobanche cumana* and *Plasmopara halstedii*. Two objectives were pursued:

- A. Creation and testing of genotypes resistant to *Plasmopara halstedii* races 730 and 714;
- B. Creation and testing of genotypes resistant to *Orobanche cumana* race E.

These objectives were achieved through the following activities:

- Evaluation of oil content and MMB (seed quantity) in lines created from interspecific populations of sunflower;
- Identification of dominant genes through segregation analysis in *Plasmopara halstedii*;
- Identification and conservation of genotypes resistant to *Orobanche cumana* and ;
- Analysis of foliar and root surface variation under normal conditions for the hybrid genotype and consanguineous lines for test optimization;
- Comparison of resistant genotypes with sensitive ones and characterization of resistance and sensitivity phenomena to *Orobanche cumana*;
- Evaluation of newly created consanguineous lines AH1538 (*H. giganteus*) and AH1104 (*H. divaricatus*).

The biological material used in the process of creating consanguineous lines resistant to *Plasmopara halstedii* and *Orobanche cumana* consisted of genotypes from wild species of sunflower, namely: *H. salicifolia*, *H. strumosus*, *H. maximiliani*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. hirsutus*, *H. nuttallii*, and *H. occidentalis*.

The research method used was as follows:

A. Evaluation of resistance to *Plasmopara halstedii* was carried out using races 730 and 714, which are among the most common in sunflower crops.

B. Evaluation of *Orobanche cumana* was conducted both in the field and in the automated rhizotron. The field evaluation was performed in areas with natural infestation of *Orobanche cumana* in Szeged, in 3 repetitions, with 4 rows per repetition in a randomized block design.

Results and discussions:

A. Regarding tolerance to *Plasmopara halstedii* races 730 and 714. The analysis of consanguineous lines of sunflower created from interspecific populations revealed the following consanguineous lines:

- *H. divaricatus*: 2 lines with heterozygous resistance (E0001 and E0002) and 1 line with homozygous resistance (E0003);

- *H. giganteus*: 2 lines with heterozygous resistance (E0004 and E0006); *H. hirsutus*: 4 lines with heterozygous resistance (E0008, E0011, E0012, E0013);

-*H. hirsutus*: 4 lines with heterozygous resistance (E0008, E0011, E0012, E0013);

-*H. maximiliani*: 8 lines with heterozygous resistance (E0020, E0023, E0026, E0029, E0030, E0032, E0035, E0036, E0037) and one line with homozygous resistance (E0023);

-*H. nuttallii*: (E0038, E0039, E0040);

-*H. occidentalis*: one line with heterozygous resistance (E0045); *H. salicifolia*: one line with homozygous resistance (E0046);

-*H. occidentalis*: line AH1223 with heterozygous resistance (E0045);

-*H. strumosus*: two lines with heterozygous resistance (E0047 and E0049) and one line with homozygous resistance (E0048).

B. Regarding resistance to the *Orobanche cumana* parasite race E under field conditions, tests conducted on the created genotypes confirm that the lines AH1102 and AH1104, derived from *H. divaricatus*, and the inbred lines AH1537 and AH1538, derived from *H. giganteus*, offer homozygous resistance to race E. The inbred lines derived from the wild species *H. hirsutus*, *H. maximiliani*, *H. nuttallii*, *H. occidentalis*, *H. salicifolia*, and *H. strumosus* did not show resistance to *Orobanche cumana* race E.

By comparing all the factors studied, it is observed that the genotype sensitive to *Orobanche cumana* is characterized by:

-a significant decrease in leaf area starting from day 30;

-inhibition of leaf and root surface growth during the 20-40 day period;

-the formation of *Orobanche cumana* nodules after a period between 20-30 days;

-after a period of 20-80 days, a significant decrease in leaf and root surface area leading to the complete disappearance of sunflower plants;

-absence of flowering.

Resistant genotypes to *Orobanche cumana* are characterized by the following aspects:

-continuous growth of leaf and root surface during the 20-40 day period;

-absence of *Orobanche cumana* root nodules;

-presence of the flowering stage.

All these characteristics are present in the inbred lines AH1538 and AH1104, created from the species *H. giganteus* and *H. divaricatus*, within the doctoral thesis.

GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

I. Method of obtaining and maintaining the inbred line B-PET1-Rf₁rfl₁ and hybrid production.

The inbred line B-PET1-Rf₁rfl₁ was analyzed over several generations, and the segregation results of the Rf₁ gene harmonized with the theoretical values, validating the method of creating inbred lines of the B-PET1-Rf₁rfl₁ type. The method of maintaining the inbred line B-PET1-Rf₁rfl₁ was validated through self-pollination and sibling (SIB) pollination, maintaining the segregation ratio of the Rf₁ gene at 3:1 and 1:1 in SIB pollination. The method of producing hybrids using the inbred line B-PET1-Rf₁rfl₁ was made possible by using the CMS forms resulting from the segregation of the Rf₁ genes. The resulting hybrids were fertile in crosses with the parental RHA forms, thus validating this process.

II. Evaluation of the possibilities of using cytological diagnosis in selecting genotypes tolerant to NaCl₂.

Cytological analyses on *Helianthus annuus* L. revealed the cytotoxic effect of saline solutions, manifested by vacuolation. Vacuolated cells show genetic material distributed uniformly or non-uniformly around the vacuole. The presence of nucleoli confirms that vacuolated cells are not in division, and their number increases with the concentration of the saline solution and the exposure duration. The phenomenon of cell vacuolation represents an important indicator for determining cellular cytotoxicity in sunflowers under saline stress. Identifying genotypes with a significantly lower vacuolation index than the control is recommended.

III. Regarding the use of in vitro cultures, immature embryos should be harvested 12 days after flowering and cultivated on MS medium supplemented with GA₃ to achieve better survival rates. Alternatively, in vivo cultivation can be used, but the number of harvested embryos must be sufficiently high to obtain the desired number of plants for subsequent acclimatization.

IV. Using interspecific populations of sunflower for obtaining genotypes resistant to *Plasmopara halstedii* 730 and 714. Inbred lines created from interspecific populations can be successfully used to obtain resistance to the most common races of *Plasmopara halstedii*. Homozygous resistance was present in genotypes E0003 (*H. divaricatus*), E0023 (*H. maximiliani*), E0046 (*H. salicifolia*), and inbred line E0048 (*H. strumosus*).

V, Using interspecific populations of sunflower to obtain genotypes resistant to *Orobanche cumana* race E. Tests conducted on the created genotypes confirm that the lines AH1102 and AH1104, derived from *H. divaricatus*, and the inbred lines AH1537 and AH1538, derived from *H. giganteus*, offer homozygous resistance to race E. Inbred

lines derived from wild species, such as *H. hirsutus*, *H. maximiliani*, *H. nuttallii*, *H. occidentalis*, *H. salicifolia*, and *H. strumosus*, did not show resistance to *Orobanche cumana* race E.

VI. Action of the *Orobanche cumana* parasite on resistant and sensitive genotypes. Results obtained with the automated rhizotron revealed that the resistant genotype exhibited a growth pattern similar to the sensitive genotype in terms of leaf and root surface during the first 20 days under both normal and infestation conditions. The resistant genotype was able to limit the negative effects caused by the *Orobanche cumana* parasite, and the plants reached the flowering stage despite infestation.

The sensitive genotype to *Orobanche cumana* is characterized by a significant decrease in leaf and root surface area and inhibition of growth rate. Sensitivity of the plants led to the formation of *Orobanche cumana* nodules and a significant decrease in leaf and root surface area leading to the complete disappearance of plants. Resistant genotypes to the *Orobanche cumana* parasite were characterized by continuous growth of leaf and root surface, absence of root nodules, and the presence of the flowering stage.

Based on our results, we recommend the following:

I. The use of consanguineous lines of the B-PET1-Rf1rf1 type should be carried out according to the genetic models created, monitoring the normal segregation ratios of the Rf1 gene. It is important to maintain a 3:1 segregation ratio in self-pollination and a 1:1 ratio in self-incompatibility (SIB) or backcrossing (BC). Optionally, molecular markers are recommended for the identification of Rf1 genes.

II. The use of cytological diagnosis in the selection of sunflower genotypes can be achieved by monitoring the vacuolization index as an indicator of salinity stress cytotoxicity. It is recommended to monitor genotypes with a significantly lower vacuolization index ($p < \alpha$) compared to the control.

III. Regarding the use of in vitro cultures, immature embryos should be collected 12 days after flowering and cultivated on GA3-supplemented MS medium. Alternatively, in vivo cultures can be used, but the number of collected embryos must be sufficiently large to obtain the desired number of plants for acclimatization.

IV. The use of interspecific populations derived from wild species *H. divaricatus* and *H. giganteus* is recommended in the development of sunflower genotypes, as these wild species offer resistance to both the parasitic plant *Orobanche cumana* and *Plasmopara halstedii*.

V. In the selection of sunflower genotypes resistant to *Orobanche cumana*, monitoring the presence or absence of root nodules, flowering periods, and maintaining a normal growth rate within the 20-80 day interval compared to sensitive genotypes is recommended.

ELEMENTS OF ORIGINALITY OF THE RESEARCH AND PERSPECTIVES

The research presented in the doctoral thesis entitled "UTILIZATION OF BIOTECHNOLOGY IN SUNFLOWER IMPROVEMENT" has contributed to solving some issues in sunflower breeding programs:

The consanguineous line B-PET1-Rf1rf1 represents an innovative biological material that contributes to the efficiency of breeding programs by reducing the number of parental forms from 3 to 2. By introducing the consanguineous line B-PET1-Rf1rf1, sunflower breeders will gain flexibility and dynamics in the breeding process, having the option to maintain this genotype through self-pollination, self-incompatibility (SIB), or a combination of both.

The use of cytological diagnosis based on the vacuolization index in the selection of sunflower genotypes allows rapid identification of genotypes with increased tolerance to salinity stress, providing an efficient selection method for breeding programs.

The supplementation of culture media and nutrient solutions with GA₃ in the process of immature embryo rescue, both in vitro and in vivo, has led to increased efficiency in immature embryo survival. Clear determination of the harvesting period and cultivation conditions in the immature embryo rescue process optimizes the rapid method of obtaining a large number of generations in a short time.

The newly created sunflower genotypes AH1538 and AH1104, derived from wild species *H. divaricatus* and *H. giganteus*, will offer new possibilities to counteract the negative effects caused by the parasitic plant *Orobanche cumana*. In the research, sunflower genotypes with homozygous resistance to the most common races of *Plasmopara halstedii* (730 and 714), namely the lines E0003 (*H. divaricatus*), E0023 (*H. maximiliani*), E0046 (*H. salicifoli*), and the consanguineous line E0048 (*H. strumosus*), have been created.

The results regarding the identification of the mode of action of the parasitic plant *Orobanche cumana* in the automated rhizotron, as well as the identification of elements of sensitivity and resistance to this parasite, will enable more efficient selection of sunflower genotypes derived from wild species. The rapid recording of these elements during certain plant growth periods ensures the optimization of rapid selection of valuable genotypes.

In perspective, continued research on the use and evaluation of interspecific populations provides significant sources of resistance in sunflower breeding programs. The biological material created and the optimization of methods for obtaining it offer new opportunities for the sunflower breeding programs

