



ADER 2.1.6/Faza 4/anul 2022

“Cercetări privind crearea și identificarea unor genotipuri de orz și/sau orzoaică de toamnă cu preabilitate superioară pentru producerea sucului de orz verde”

Activități realizate în proiectul ADER 2.1.6, faza IV

**INCDA FUNDULEA
FAZA 4**

1. Crearea de materialului biologic nou prin realizarea de hibridări în vederea obținerii de material de preameliorare cu caractere specifice obiectivului proiectului

30 HIBRIZI

2. Caracterizarea finală a comportării genotipurilor de orz și/sau orzoaică de toamnă sub aspectul indexului de diferențiere vegetative

DETERMINARE CU APARATUL “GREEN SEEKER” PENTRU CELE DOUĂ CONDIȚII DE CULTIVARE

3. Recoltarea și evaluarea preliminară a cantității și randamentului biomasei (kg/ha masă verde)

4. Recoltarea, evaluarea și caracterizarea finală a capacității de producție a genotipurilor de orz și/sau orzoaică de toamnă testate în câmpul experimental în diverse condiții diferite de cultivare (densități variabile și plantă premergătoare leguminoasă; organizarea unei întâlniri de lucru cu părțile interesate; elaborarea a 2 broșuri cu rezultatele obținute în cadrul proiectului

**INCDMM
CANTACUZINO
FAZA 4**

1. Optimizarea procedeeului de obținere a sucului de orz verde cu capacitate antioxidantă superioară și definitivarea metodologiei de caracterizare a produsului obținut, elaborarea și depunerea cererii de brevet de invenție pentru metoda de obținere a sucului de orz verde din orz și/sau orzoaică de toamnă.

Activitate IV.1

IV.1 Crearea de materialului biologic nou prin realizarea de hibridări în vederea obținerii de material de preameliorare cu caractere specifice obiectivului proiectului

Hibridările au fost realizate în luna aprilie în cadrul câmpului special înființat pentru hibrizii de orz și orzoaică de toamnă (30 hibrizi).

Din câmpul de hibrizi au fost recoltate combinațiile în luna iulie, acestea fiind promovate în F_1 iar în urma condiționării manuale a spicelor obținute, au fost semănate în parcele a câte 3 sau 4 rânduri în funcție de numărul de semințe obținute.



ACTIVITATE IV.2

Caracterizarea comportării genotipurilor de orz și/sau orzoaică de toamnă sub aspectul indexului de diferențiere vegetativ, corespunzător condițiilor diferite de cultivare, analize moleculare pentru detectarea unor regiuni genomice implicate în "stay-green" .

Au fost executate determinări cu aparatul Green Seeker în perioada de vegetație în două condiții diferite de cultivare (rezultate prezentate în tabelele 1 și 2).



Valorile Green Seeker obținute la orzul de toamnă în două condiții de mediu
(fără aplicare de azot) Tabelul 1

Condiția de mediu 1	Valori Green Seeker	Condiția de mediu 2	Valori Green Seeker
01-01 D1	0.81	01-01 D2	0.82
01-02 D1	0.81	01-02 D2	0.82
01-03 D1	0.82	01-03 D2	0.82
01-04 D1	0.82	01-04 D2	0.82
01-05 D1	0.81	01-05 D2	0.81
01-06 D1	0.81	01-06 D2	0.82
01-07 D1	0.81	01-07 D2	0.82
01-08 D1	0.80	01-08 D2	0.81
01-09 D1	0.81	01-09 D2	0.81
01-10 D1	0.82	01-10 D2	0.81
01-11 D1	0.82	01-11 D2	0.82
01-12 D1	0.81	01-12 D2	0.82
01-13 D1	0.79	01-13 D2	0.80
01-14 D1	0.80	01-14 D2	0.83
01-15 D1	0.83	01-15 D2	0.81
01-16 D1	0.81	01-16 D2	0.80
01-17 D1	0.81	01-17 D2	0.80
01-18 D1	0.80	01-18 D2	0.81
01-19 D1	0.81	01-19 D2	0.81
01-20 D1	0.81	01-20 D2	0.81
01-21 D1	0.81	01-21 D2	0.82
01-22 D1	0.81	01-22 D2	0.81
01-23 D1	0.82	01-23 D2	0.83
01-24 D1	0.82	01-24 D2	0.81

- valoarea obținută reprezintă media a 5 valori, realizată direct de aparat

- valorile au variat de la 0,79 la 0,84 în ambele condiții de cultivare, cu mențiunea că în ansamblu acestea au fost mai ridicate de la 0,80 la 0,83 (01-16, 01-23) în condiția de cultivare la o densitate clasică (500 b.g/m²).

- variantele 01-03, 01-04 și 01-11 (prima condiție de cultivare) au înregistrat valori similare în ambele condiții de testare (0,82), demonstrând o bună utilizare a azotului din sol de la planta premergătoare (mazăre) în condițiile de secetă din anul acesta.

Valorile Green Seeker obținute la orzoaica de toamnă în două condiții de mediu

(fără aplicare de azot)

Tabelul 2

Condiția de mediu 1	Valori Green Seeker	Condiția de mediu 2	Valori Green Seeker
21-01 D1	0.81	21-01 D2	0.82
21-02 D1	0.79	21-02 D2	0.82
21-03 D1	0.80	21-03 D2	0.82
21-04 D1	0.81	21-04 D2	0.81
21-05 D1	0.81	21-05 D2	0.81
21-06 D1	0.80	21-06 D2	0.81
21-07 D1	0.79	21-07 D2	0.81
21-08 D1	0.82	21-08 D2	0.82
21-09 D1	0.81	21-09 D2	0.83
21-10 D1	0.82	21-10 D2	0.82
21-11 D1	0.80	21-11 D2	0.82
21-12 D1	0.81	21-12 D2	0.82
21-13 D1	0.80	21-13 D2	0.81
21-14 D1	0.79	21-14 D2	0.81
21-15 D1	0.78	21-15 D2	0.80
21-16 D1	0.79	21-16 D2	0.77
21-17 D1	0.81	21-17 D2	0.81
21-18 D1	0.81	21-18 D2	0.83
21-19 D1	0.71	21-19 D2	0.73
21-20 D1	0.78	21-20 D2	0.80
21-21 D1	0.76	21-21 D2	0.77
21-22 D1	0.74	21-22 D2	0.77
21-23 D1	0.76	21-23 D2	0.80

- genotipurile de la 21-01 D1 și 21-01 D2 (tabelul 2) au prezentat o variație mai largă cuprinsă între 0,71 (variante 21-19 în condiția de mediu 1) și 0,83 (în condiția de mediu 2)
- în cazul orzoaicei de toamnă (tabelul 2) au fost înregistrate valori mai ridicate în condiția de mediu 2 (0,73-0,83) prin comparație cu valorile de la 0,71 la 0,81 în cealaltă condiție de mediu.
- varianta 21-04 D1 (culoarea albastră) a înregistrat valori identice în ambele condiții de testare (0,81), ceea ce demonstrează că în cazul acestui genotip de orzoaică de toamnă, în ceea ce privește eficiența utilizării azotului din sol de la planta premergătoare, este similară.

- genotipurile testate (50 genotipuri de orz și orzoaică de toamnă) au fost analizate cu un marker nou KASP-SCRI_RS_225155. Acest marker indică absența sau prezența unor caractere calitative specifice dar acestea sunt întotdeauna detectabile, indiferent de mediul de cultivare sau de tehnologia aplicată.
- în aceasta etapă au fost efectuate analize moleculare privind evidențierea SNP-ului C/T de la nivelul genei HPT-7H, prin tehnica KASP (Kompetitive Allele -Specific PCR) pe un sortiment de 50 linii de orz pentru unul dintre principalii antioxidanți, și anume vitamina E.

Activitățile desfășurate în vederea detectării au fost următoarele:

- Izolare ADN;
- Amplificare ADN;
- Electroforeză produși PCR.



Fig. 1. Gruparea genotipurilor analizate cu markerul KASP-SCRI_RS_225155 (NTC-probe de control, fără ADN)

Rezultate obținute în urma analizei moleculare


Tabelul nr. 3. Rezultatele analizei moleculare cu markerul
KASP-SCRI_RS_225155

Nr.crt.	Linie	Orz-VitE-KASP - 7H-225155
1	01-01/20	C
2	01-02/20	T
3	01-03/20	C
4	01-04/20	C
5	01-05/20	T
6	01-06/20	C
7	01-07/20	C
8	01-08/20	C
9	01-09/20	C
10	01-10/20	C
11	01-11/20	T
12	01-12/20	C
13	01-13/20	C
14	01-14/20	C
15	01-15/20	T
16	01-16/20	C
17	01-17/20	T
18	01-18/20	T
19	01-19/20	C
20	01-20/20	C
21	01-21/20	C
22	01-22/20	C
23	01-23/20	C
24	01-24/20	C

Tabelul nr. 4. Rezultatele analizei moleculare cu markerul
KASP-SCRI_RS_225155

Nr.crt.	Linie	Orz-VitE-KASP - 7H-225155
26	21-01/20	C
27	21-02/20	C
28	21-03/20	C
29	21-04/20	C
30	21-05/20	C
31	21-06/20	T
32	21-07/20	C
33	21-08/20	C
34	21-09/20	T
35	21-10/20	C
36	21-11/20	C
37	21-12/20	T
38	21-13/20	C
39	21-14/20	C
40	21-15/20	T
41	21-16/20	T
42	21-17/20	T
43	21-18/20	C
44	21-19/20	C
45	21-20/20	C
46	21-21/20	C
47	21-22/20	C
48	21-23/20	C
49	21-24/20	T

C 
High-tocopherol

 T
Low-tocopherol

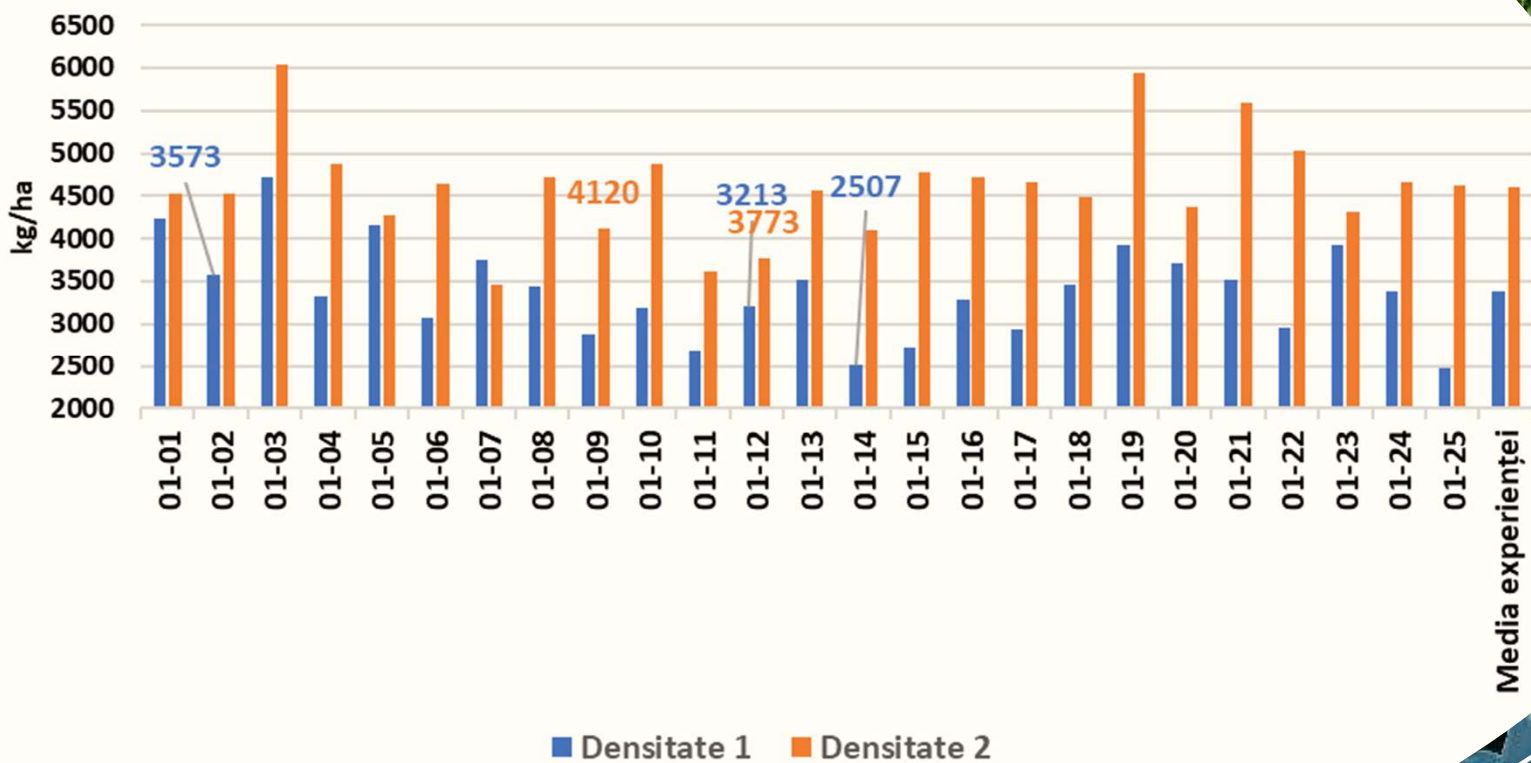
Activitate IV.3.

Recoltarea și evaluarea preliminară a cantității și randamentului biomasei genotipurilor de orz și/sau orzoaică de toamnă (50 genotipuri) în condiții de cultivare diferite (densități variabile și plantă premergătoare leguminoasă)

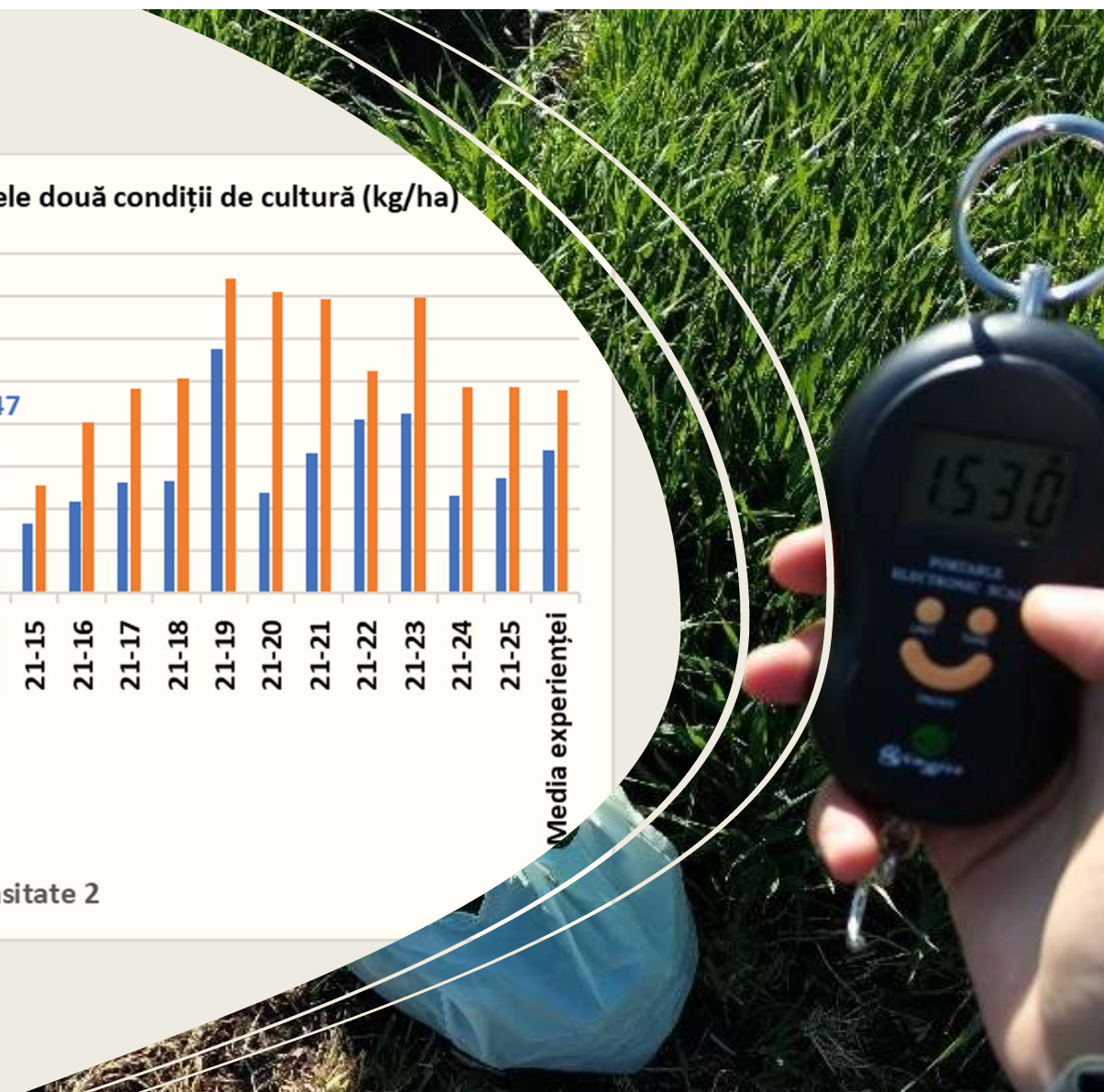
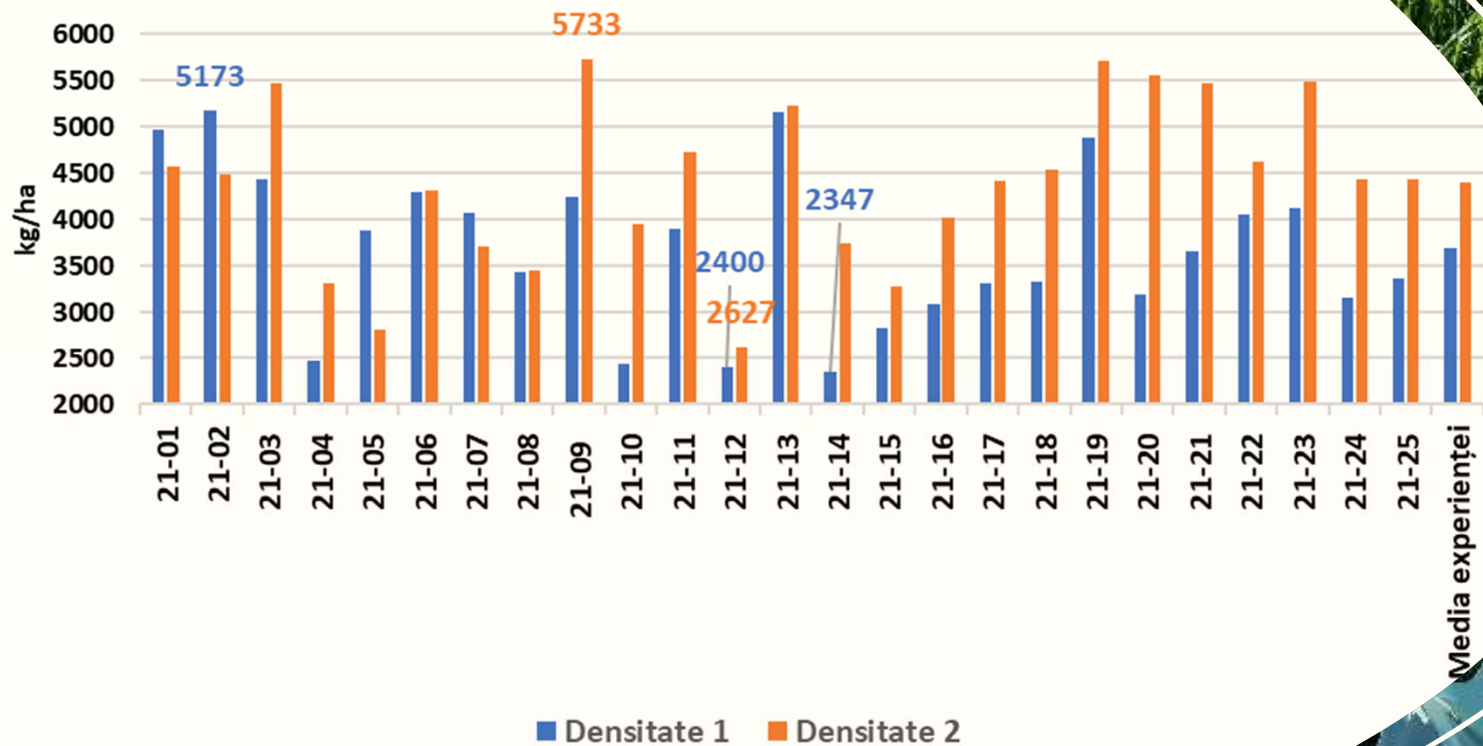
Evaluarea cantității de biomasă s-a realizat prin recoltare manuală (tăierea plantelor de la nivelul solului) și cântărire în același timp pentru cele 2 condiții de cultivare diferite (2 densități de boabe/m² și plantă premergătoare mazăre) fără aplicare de azot (cantitatea de biomasă obținută fiind raportată la unitatea de suprafață).



Biomasa obținută pentru orzul de toamnă în cele două condiții de cultură (kg/ha)



Biomasa obținută pentru orzoaica de toamnă în cele două condiții de cultură (kg/ha)



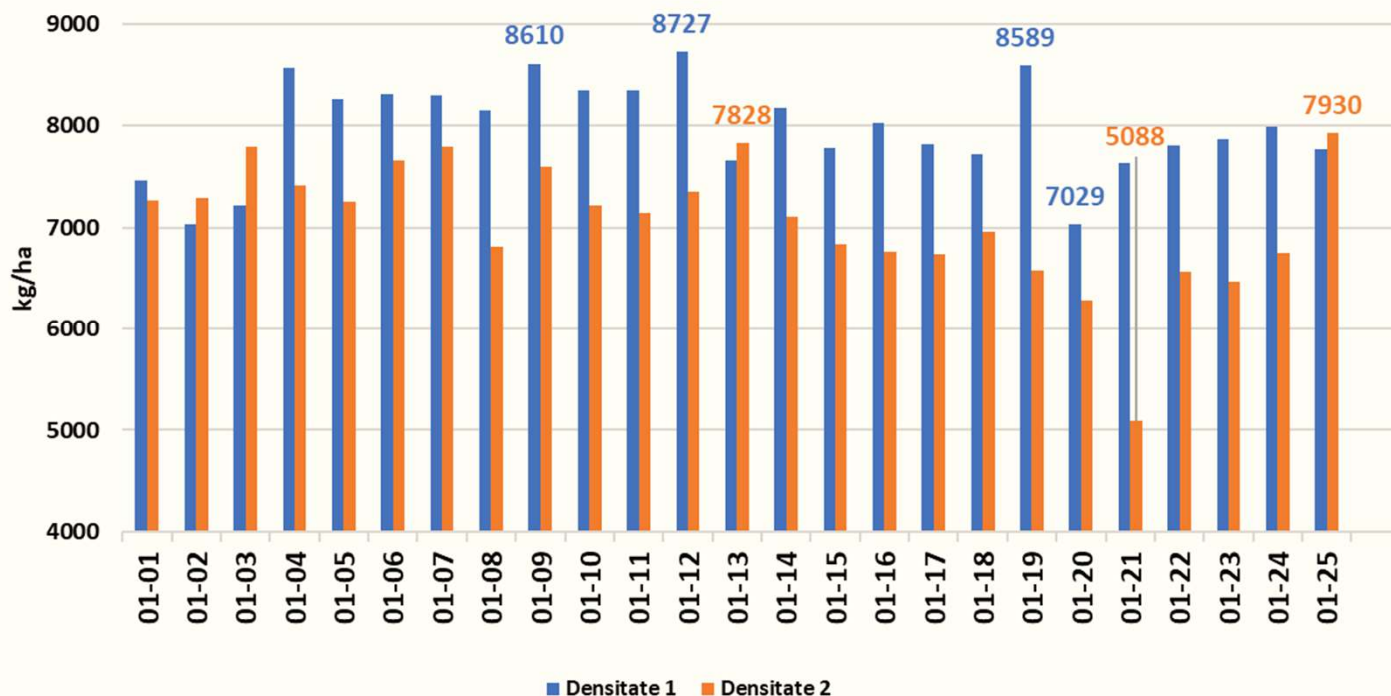
Activitate IV.4.

Recoltarea, evaluarea și caracterizarea finală a capacității de producție a genotipurilor de orz și/sau orzoaică de toamnă testate în câmpul experimental în diverse condiții diferite de cultivare (densități variabile și plantă premergătoare leguminoasă; organizarea unei întâlniri de lucru cu părțile interesate; elaborarea a 2 broșuri cu rezultatele obținute în cadrul proiectului

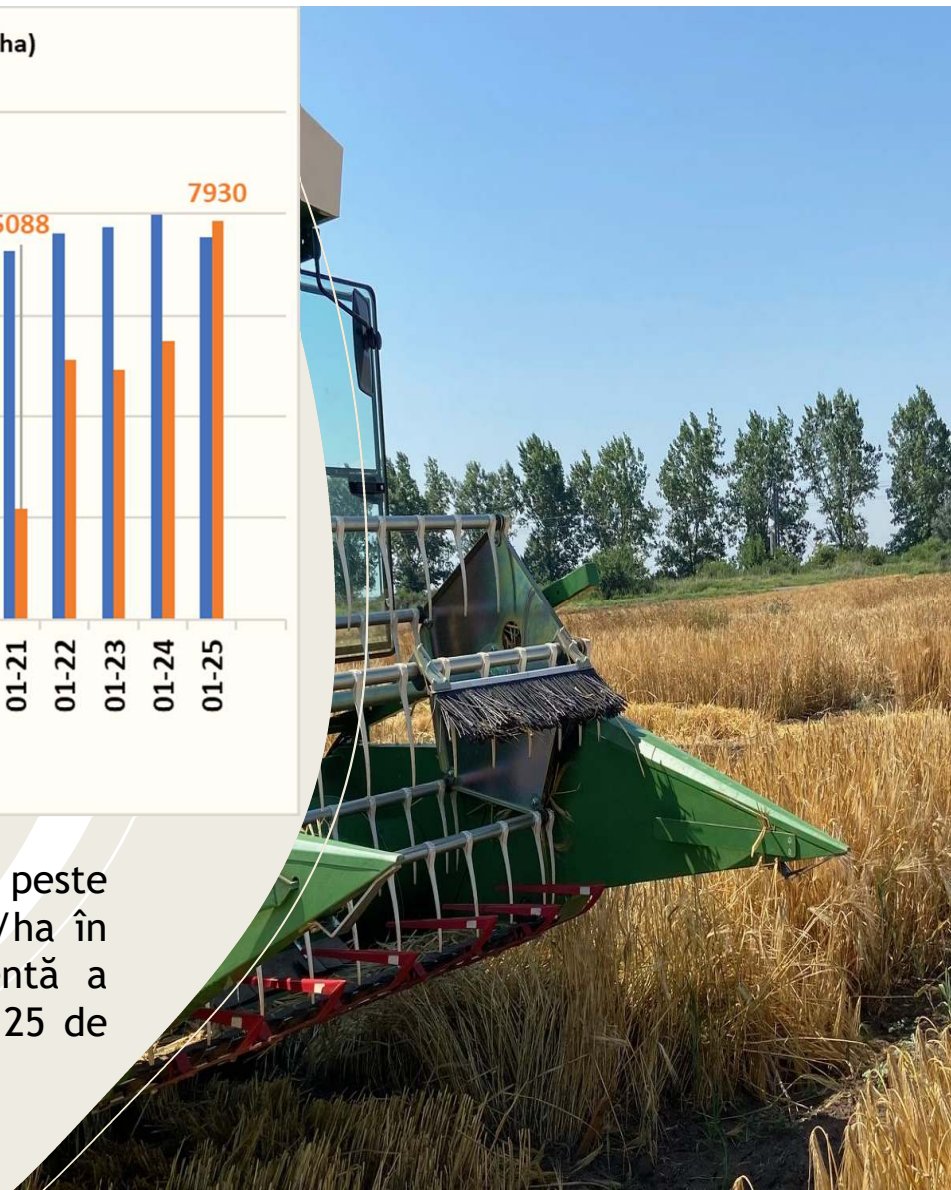
Au fost realizate 2 broșuri cu rezultatele obținute în cadrul proiectului; a fost organizată întâlnirea de lucru cu părțile interesate pentru a selecta anumite genotipuri cu însușiri corespunzătoare obiectivului proiectului; s-a realizat prezentarea rezultatelor obținute în anul trei de derulare a proiectului pe pagina web (prezentare Powerpoint).



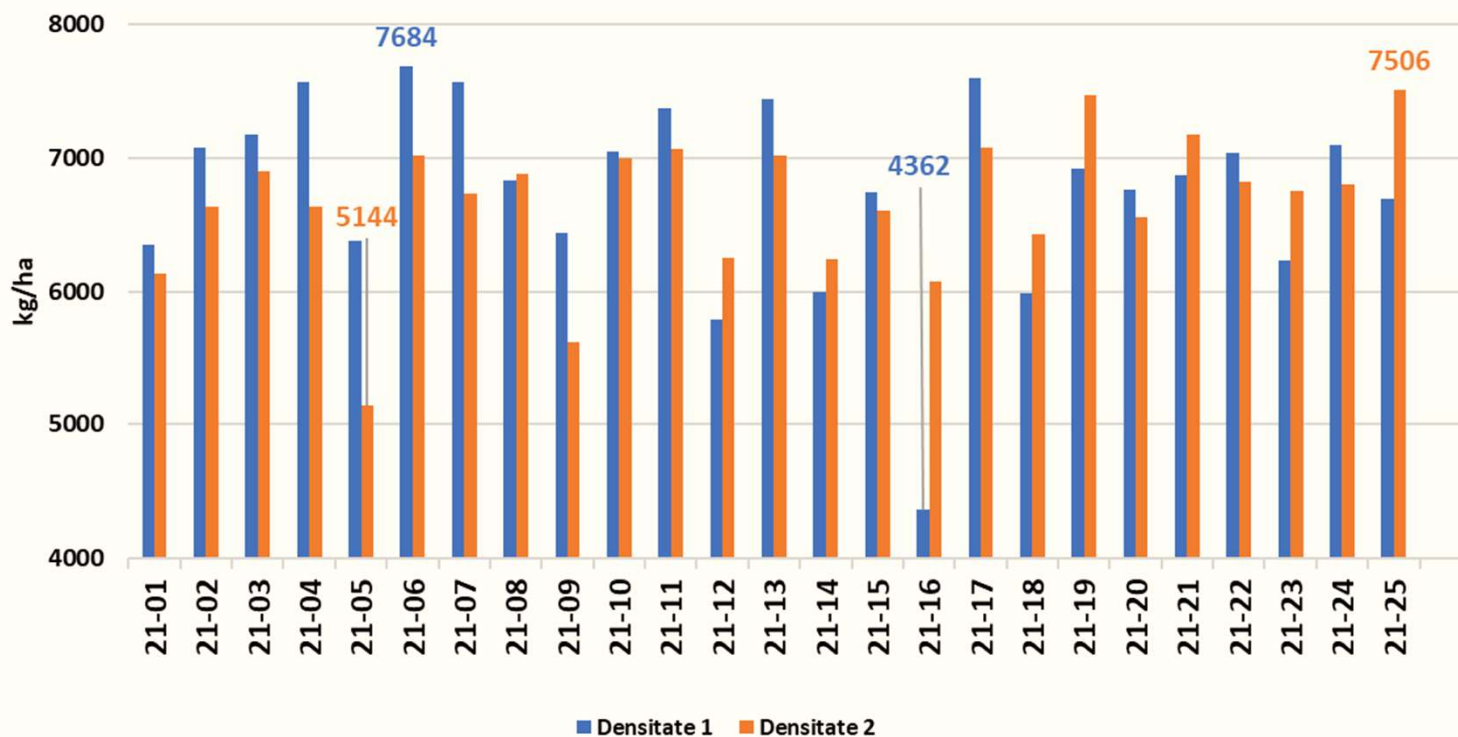
Producția obținută pentru orzul de toamnă în cele două condiții de cultură (kg/ha)



Majoritatea genotipurilor au obținut producții de semințe de peste 7 t/ha (7029-8727 kg/ha în prima condiție și 5088-7128 kg/ha în condiția de mediu 2), ceea ce denotă o utilizare eficientă a azotului din sol de la planta premergătoare, în cazul celor 25 de variante de orz de toamnă.



Producția obținută pentru orzoaica de toamnă în cele două condiții de cultură (kg/ha)



Capacitatea de producție la orzoaica de toamnă a fost influențată semnificativ de genotip și de condițiile de cultivare (densități diferite). Astfel, nivelul productiv a variat de la 4362 kg/ha (21-16 D1) la 7684 kg/ha (21-06 D1) în condiția 1.

În cea de a doua condiție, capacitatea de producție a fost mai ridicată în ceea ce privește valoarea minimă prin comparație cu cea realizată în cealaltă condiție, aceasta atingând nivelul de 5144 kg/ha (21-05).

Capacitatea maximă de producție a fost înregistrată de genotipul 21-06, aceasta fiind de 7684 kg/ha.



INCDMM
Cantacuzino
(P1)

1. Optimizarea procedeeului de obținere a sucului de orz verde cu capacitate antioxidantă superioară și definitivarea metodologiei de caracterizare a produsului obținut, elaborarea și depunerea cererii de brevet de invenție pentru metoda de obținere a sucului de orz verde din orz și/sau orzoaică de toamnă.

Rezultate

Rezultatele obținute prin metodele Bradford, TAC (Total Antioxidant Capacity Assay) și ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) sunt prezentate în tabelul 9.

În scopul interpretării diferențelor observate între orz (O1) și orzoaică de toamnă (O2), respectiv între cele două densități de cultivare (D1 și D2), cele 100 de loturi au fost împărțite ulterior în patru categorii: O1D1, O1D2, O2D1, O2D2.

Tabelul 9.

Proba	Conținut în proteine prin metoda Bradford (mg/mL)		Capacitate antioxidantă prin metoda TAC (mM TE)		Capacitate antioxidantă prin metoda ORAC (mM TE)
	filtrat	nefiltrat	proba - protein mask	proba + protein mask	filtrat
01 D1	10.84	14.07	31.86	31.44	26.88
21 D1	10.72	13.95	31.05	30.50	31.65
01 D2	8.68	11.30	20.04	20.43	26.21
21 D2	9.69	10.86	23.58	23.41	26.84

Diferențele între probele nefiltrate și cele filtrate au fost ne semnificative. În ansamblu, au fost observate diferențe semnificative ale concentrației proteice la compararea grupurilor de loturi de orz cu cele de orzoaică de toamnă (O1D1 vs. O2D1, respectiv O1D2 vs. O2D2).

Dozarea proteinelor prin metoda Bradford

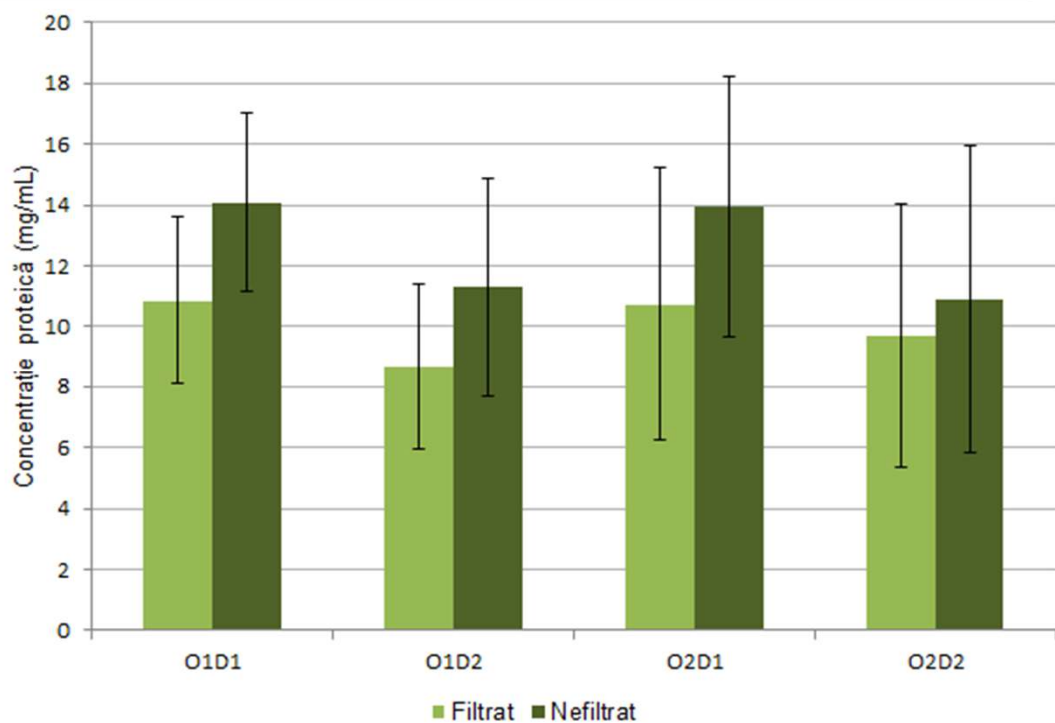


Figura 2. Variația concentrației proteice (filtrat vs. nefiltrat) a sucurilor corespunzătoare celor 50 de genotipuri cultivate la densități diferite (D1 și D2).

În ceea ce privește valorile corespunzătoare celor două densități de cultivare, loturile cultivate la densitatea D1 au prezentat în medie concentrații de proteine mai ridicate în comparație cu cele cultivate la densitatea D2.

Acest aspect a fost valabil atât pentru orz (O1D1 vs. O1D2), cât și pentru orzoaică de toamnă (O2D1 vs. O2D2), sugerând faptul că densitatea de cultivare influențează concentrația proteică a sucului vegetal obținut, în cazul unei densități de cultivare mai mari manifestându-se inhibiția de creștere și dezvoltare.

Capacitatea antioxidantă totală (Total Antioxidant Capacity, TAC)

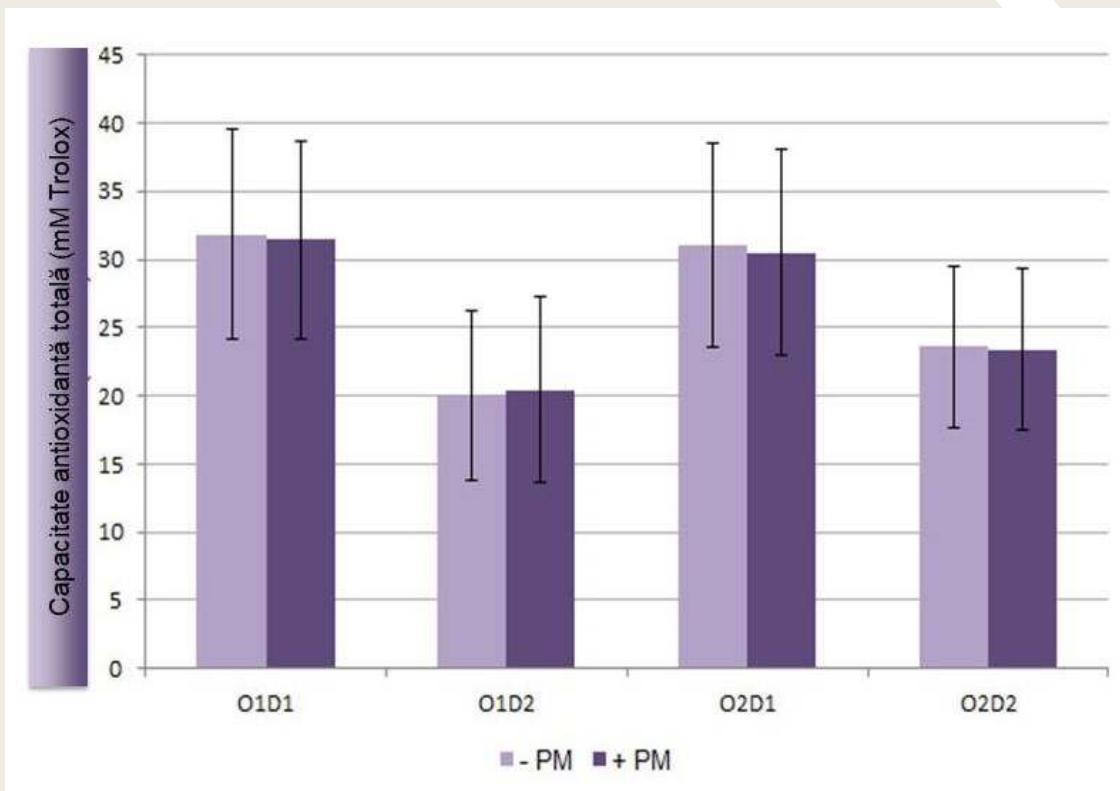


Figura 3. Variația capacității antioxidante a sucurilor corespunzătoare celor 50 de genotipuri cultivate la densități diferite, fără Protein Mask (- PM) și cu Protein Mask (+ PM)

Rezultatele privind capacitatea antioxidantă totală, evidențiază diferențe între cele două densități de cultivare: astfel, sucurile vegetale obținute din loturile care au fost însămânțate la densitatea D1 prezintă, în medie, o activitate antioxidantă mai mare comparativ cu cele obținute din același produs vegetal însămânțat la densitatea mai mare, D2 (Figura 3). În plus, nu au fost observate diferențe semnificative între valorile medii corespunzătoare celor două categorii de loturi de orz comparativ cu orzoaica de toamnă (O1D1 vs. O2D1, respectiv O1D2 vs. O2D2).

Capacitatea antioxidantă determinată prin metoda ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity)

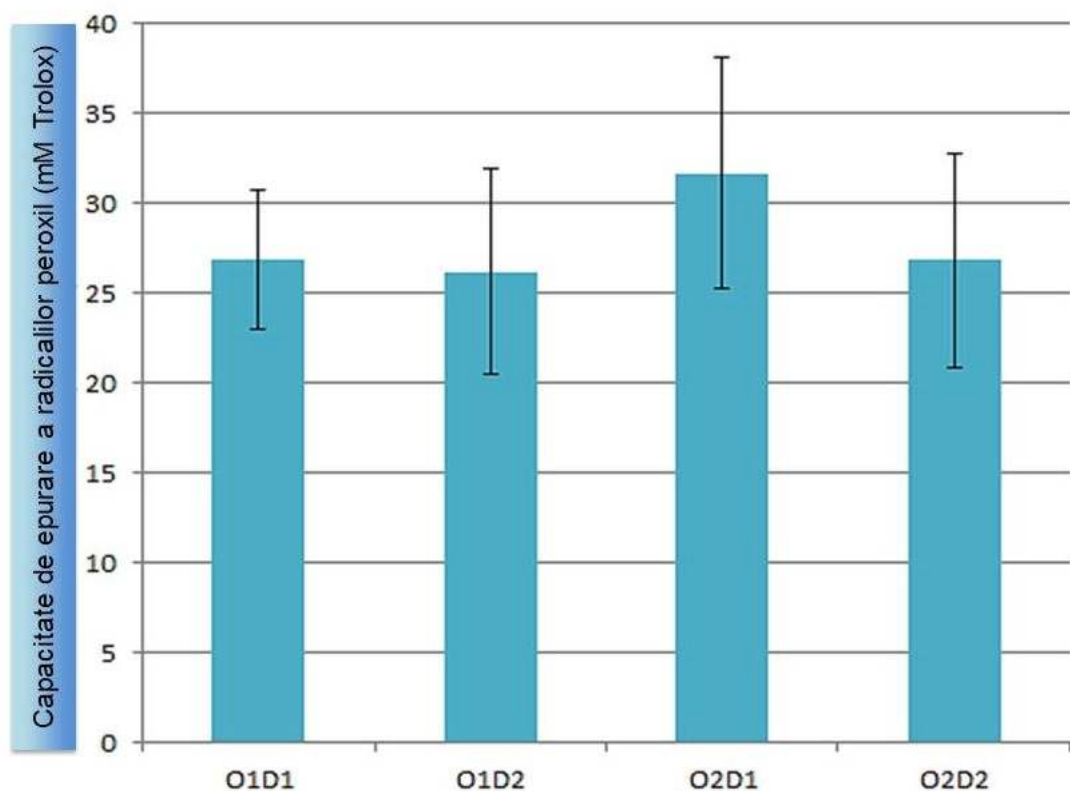


Figura 4. Variația capacității antioxidante corespunzătoare celor 50 de genotipuri cultivate la densități diferite

Prin analiza rezultatelor privind capacitatea antioxidantă (în special de epurare a ROS) evaluată prin metoda ORAC au fost observate diferențe nesemnificative în ceea ce privește densitatea de cultivare pentru loturile de orz (O1D1 vs. O1D2); în cazul loturilor de orzoaică de toamnă, condițiile de cultivare D2 au fost asociate cu o valoare medie mai scăzută a capacității antioxidante (**Figura 4**).

Categoria O2D1 (orzoaică de toamnă cultivată la densitatea D1) s-a remarcat prin valori mai ridicate ale capacității antioxidante măsurate prin această metodă, comparativ cu categoriile O1D1, O1D2, O2D2.

Rezultatele obținute prin cele două metode TAC și ORAC sunt similare, ceea ce sugerează faptul că proprietățile antioxidante ale sucului de orz se datorează în primul rând moleculelor cu greutate moleculară mică, nu celor mari, de tipul proteinelor.

CONCLUZII

Testarea conținutului în proteine și a capacității antioxidante totale au dus la concluzia că, din cele 100 de loturi de orz și orzoaică de toamnă testate, cele însămânțate la densitatea mai mică (D1) au un conținut mediu în proteine și compuși antioxidanți mai mare comparativ cu genotipurile însămânțate la o densitate mai mare. Orzul și orzoaica de toamnă prezintă proprietăți antioxidante similare, atât în cazul capacității antioxidante totale măsurate cu ajutorul unui kit comercial, cât și în cazul capacității de epurare a radicalilor evaluate prin metoda ORAC (Oxygen Radicals Absorbance Capacity).

Analiza valorilor individuale a dus la identificarea, în ani succesivi, a unor genotipuri cu capacitate antioxidantă crescută. Datele obținute au stat la baza cererii de brevet de invenție nr A100558/12.09.2022, cu titlul “Procedeu de obținere a unui supliment alimentar antioxidant buvabil, prin amestecul sucului obținut din trei genotipuri de orz și orzoaică de toamnă”.

CONCLUZII

Proiectul se finalizează în luna septembrie 2022 iar datele obținute vor fi valorificate prin publicarea unui articol științific într-o revistă de specialitate și prin depunerea unei cereri de brevet de invenție privind procedeul de obținere (inclusiv metodologia de control asociată) pentru suplimente alimentare antioxidante pe bază de orz/orzoaică de toamnă.

Activitățile prevăzute în cadrul fazei 4 a proiectului s-au derulat conform planului de realizare propus, rezultatele obținute al treilea an consecutiv a demonstrat că există genotipuri cu un potențial deosebit (cantitativ referitor la biomasă și calitativ cu privire la suc), în prezent fiind testate 2 linii noi de perspectivă pretabile pentru producerea sucului de orz verde (F 8-24-2018 și F8-6-2018).

CONCLUZII

Având în vedere obiectivul proiectului, acela de a crea și identifica genotipuri de orz și/sau orzoaică de toamnă cu preabilitate superioară pentru producerea sucului de orz verde în vederea obținerii a 2 linii noi de orz și/sau orzoaică, predate la ISTIS (pentru înregistrare și brevetare) și depunerea unei cereri de brevet de invenție pentru metoda de obținere a sucului de orz verde din orz și/sau orzoaică de toamnă, putem afirma că activitățile au fost îndeplinite integral.