




MINISTERUL AGRICULTURII  
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

## ADER 3.2.1. Faza 1/2019



Accelerarea progresului genetic pentru rezistența sau toleranța la unii factori biotici și abiotici de mediu importanți pentru cultura grâului, prin elaborarea unor modalități de selecție timpurie cu ajutorul markerilor moleculari



## ADER 3.2.1.

**Proiect finanțat prin:** Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale

**Tip proiect:** Plan Sectorial 2019-2022 - ADER 2022

**Acronim proiect:** ADER 3.2.1.

**Contract nr.:** 321/17.09.2019

**Valoarea proiectului:** 850000 lei

**Durata proiectului:** 36 luni

**Perioada de derulare:** 17.09.2019-30.09.2022

**Autoritatea Contractantă:** Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, Plan sectorial pentru cercetare-dezvoltare din domeniul agricol pe anii 2019-2022.

### CONSORȚIU PROIECT

**Contractor:** Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea

**Director de proiect:** Dr. Matilda Ciucă


**Partener:** Institutul de Biologie București al Academiei Române

**Responsabil proiect:** Dr. Florența-Elena Helepciuc

## Introducere

Producția de grâu este amenințată de factori biotici și abiotici neașteptați din cauza schimbărilor bruște de mediu sau a migrării agenților patogeni. În plus, urbanizarea a dus la reducerea disponibilității de terenuri agricole adecvate pentru cultivarea grâului. Totodată, monocultura culturilor moderne de grâu cu o diversitate genetică scăzută a dus la apariția/reapariția unor patogeni, care amenință productivitatea și calitatea grâului (Figueroa și colab., 2017). În acest sens, identificarea acelor componente ce permit grâului evitarea acțiunii stresurilor, cât și îmbogățirea fondului genetic actual sunt necesare pentru a face față provocărilor prezente și prognozate, determinate de schimbările climatice, sunt unanim acceptate de comunitatea științifică.

Senescența întârziată sau păstrarea stadiului verde o perioadă mai mare după anteză contribuie la o remobilizare a nutrienților și o perioadă mai lungă de umplere a boabelor de grâu. Gregersen și colab. (2008) a raportat o corelație pozitivă între senescența întârziată a culturii și randamentul cerealelor. Degradarea clorofilei este principalul indicator al senescenței frunzelor și este catalizată de o serie de enzime, precum feofitinaza - “Pheophytin pheophorbide hydrolase - PPH” (Wang și colab., 2019). Gena ce codifică pentru această enzimă se numește *TaPPH-7A* și este localizată pe cromozomul 7A, în apropierea centromerului, mărginită de *Xwmc9* (0,94cM) și *AX-95634545* (1.04 cM).



ADER 3.2.1/2019

Obiectivul general al proiectului (nr.3): **Dezvoltarea de cercetări fundamentale, în scopul deschiderii de noi căi de progres în cercetarea aplicativă.**

Obiectivul specific al proiectului (3.2): **Explorarea a noi căi de scurtare a perioadei de creare de soiuri.**

#### DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ

Faza: nr.1- Documentare și inițierea optimizării de metode și tehnologii de laborator.

Faza 1 din cadrul acestui proiect s-a desfășurat pe perioada 18.09.2019-31.10.2019 (32 zile).

Obiectivele fazei:

- Caracterizarea moleculară a unui sortiment de linii/soiuri de grâu privind variantele alelice ale genei *TaPPH* implicată în senescență.
- Documentarea și inițierea optimizării de metode laborator pentru microscopia optică în scopul evidențierii unor caracteristici corelate cu rezistența la deficitul hidric (densitatea stomatelor, cuticula ventrală și dorsală a frunzei) și a distribuției ligninei la nivelul tulpinii de grâu;

## Activitățile proiectului ADER 3.2.1, faza 1/2019

**Activitatea 1.1-** Documentare și achiziționarea necesarului pentru realizarea experimentelor.

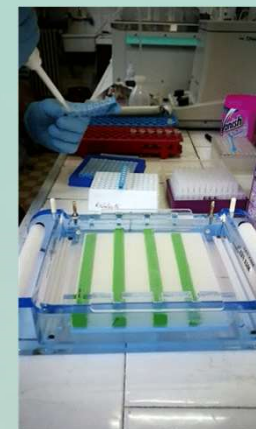
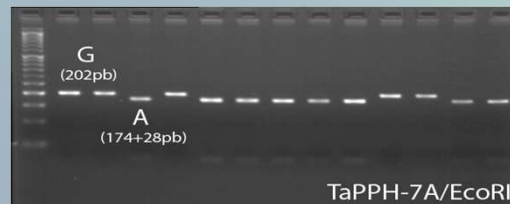
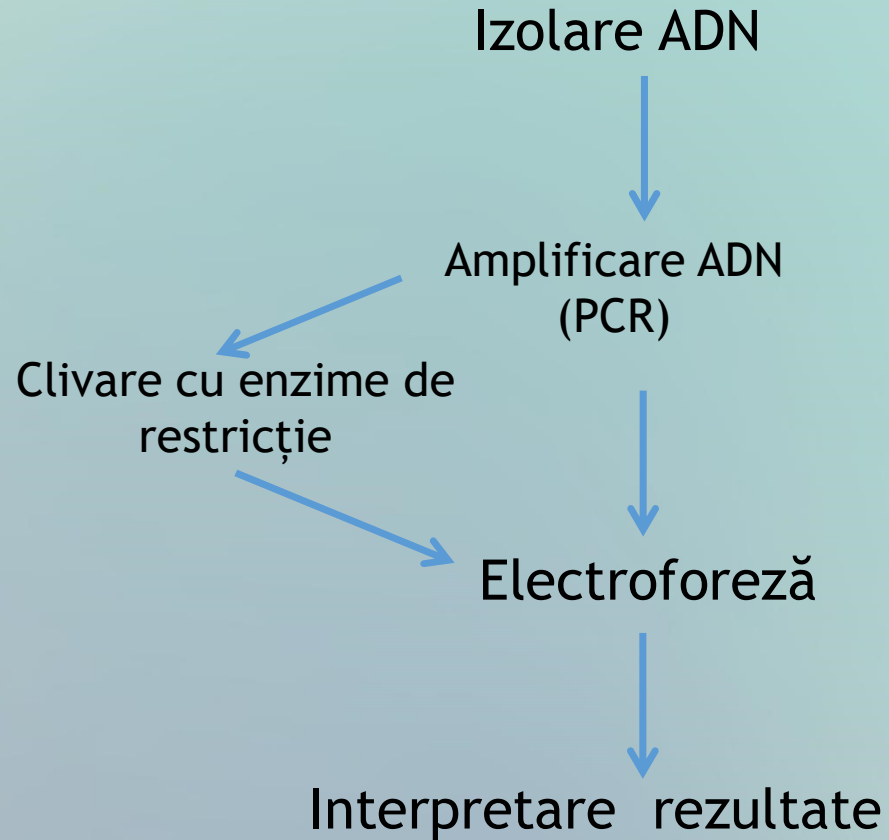
**Activitatea 1.2-** Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei TaPPH implicată în senescența frunzelor de grâu.

**Activitatea 1.3-** Selecția metodelor histochimice și a protocoalelor pentru microscopie cu adaptarea acestora la particularitățile materialului biologic utilizat.

**Activitatea 1.4-** Realizarea dispozitivului experimental pentru testarea materialului biologic și întocmirea planului experimental pentru obținerea de noi linii de introgresie.

ADER 3.2.1/2019

# Tehnici de lucru markeri moleculari



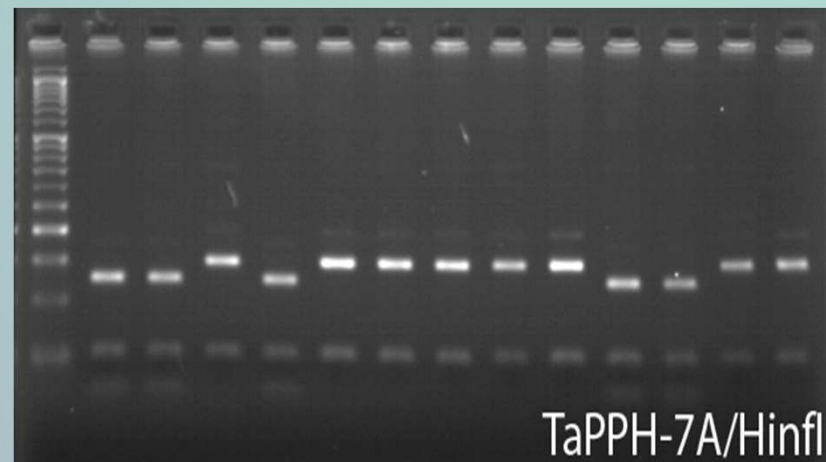
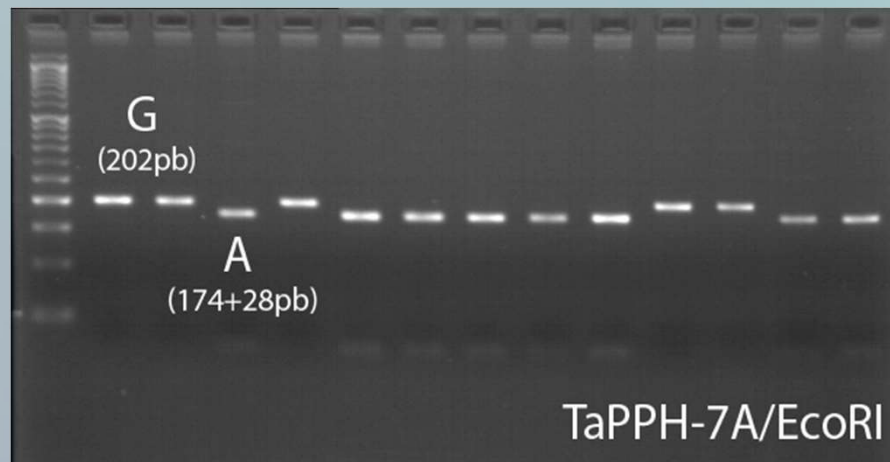
ADER 3.2.1/2019

## Rezultate fază I

Analizele efectuate pentru evidențierea haplotipurilor genei *TaPPH-7A* au condus la identificarea a 8 genotipuri (din 23 analizate) ce prezintă alela favorabilă *TaPPH-7A-1* (A), reprezentând 35%. Dintre acestea, trei sunt soiuri străine (Kukri și Drysdale din Australia; Renesansa din Serbia).

Prin urmare doar cinci genotipuri autohtone, din cele analizate până în prezent, prezintă alela favorabilă (Armura, Bogdana, G574-6, G603 și E28) iar în cazul speciei diploide *Aegilops comosa* (genom MM) nu s-a amplificat nici un produs PCR.

Prima încercare de evidențiere de polimorfism la nivelul locusului genei *TaPPH*, altul decât cel existent, a presupus clivarea produsului PCR cu enzima de restricție *Hinfi*. Rezultatele au arătat tot două variante: varianta 1 (151pb+51pb) similară variantei alelice *TaPPH-7A-2* (G) și varianta 2 (135 pb+51pb+16pb) similară variantei favorabile *TaPPH-7A-1* (A), prin urmare, până în prezent, nu s-a identificat o nouă variantă alelică.



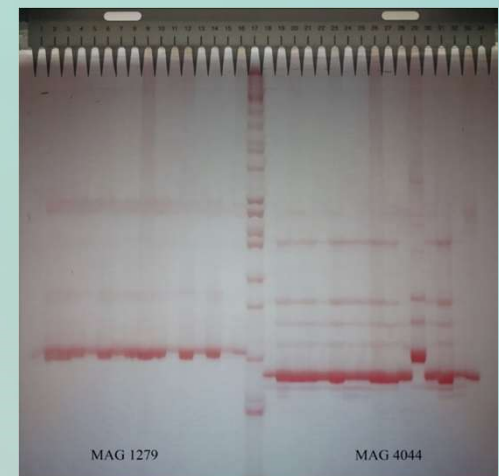
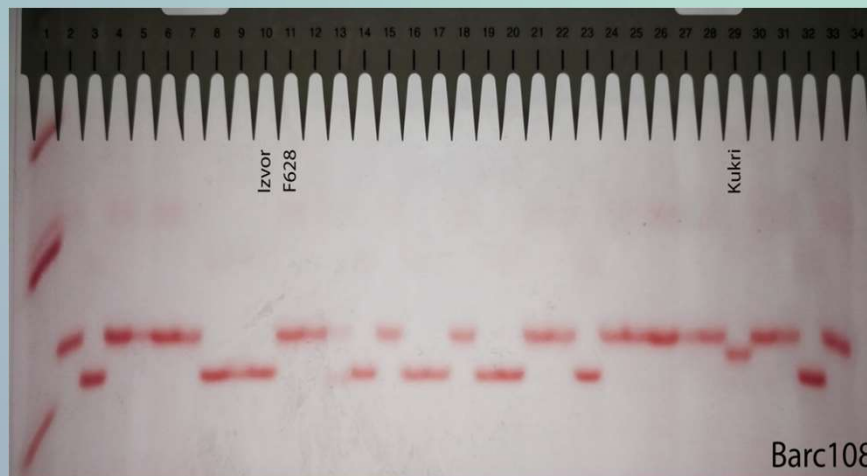
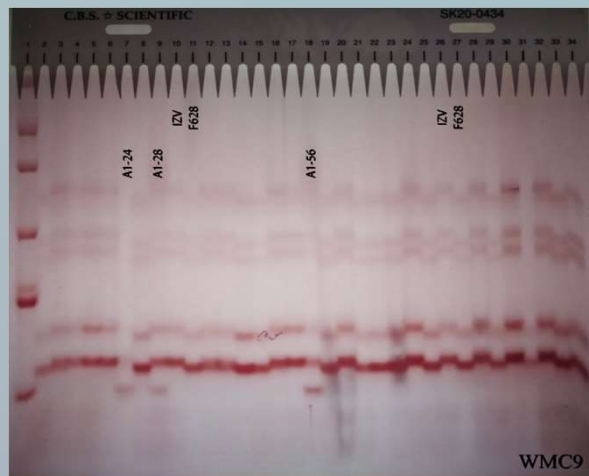
Soi/linie	TaPPH
G574-6	A
Abundent	G
Ae. comosa	-
Amurg	G
Arieșan	G
Armura	A
Baltag	G
Bogdana	A
Drysdale	A
E28	A
F628	G
G603	A
G613	G
Glosa	G
Izvor	G
Kukri	A
Miranda	G
Otilia	G
Pitar	G
Renesansa	A
Semnal	G
Ursita	G
Voinic	G

ADER 3.2.1/2019

## Rezultate fază I

Soiul de grâu Izvor (care nu a prezentat varianta alelică favorabilă a genei *TaPPH*) este considerat un soi tolerant la secetă, având în genomul său alela favorabilă or implicată în osmoreglare, permițându-i acestui soi, printr-un mecanism indirect, să prezinte o senescență târzie în condiții de secetă. Știind ca această genă se află în apropierea markerului *wmc9* ca și gena *TaPPH* am efectuat analize moleculare cu markerul *wmc9* pe un sortiment de 110 genotipuri și am inițiat analizele moleculare cu markerul *Barc108* cu localizare pe cromozomul 7A, în apropierea markerului *wmc9*.

Analizele moleculare au scos în evidență un polimorfism mai mare la nivelul markerului *wmc9* (8 alele) față de *Barc108*. Totodată, rezultatele obținute cu acest marker nu coincid cu cele obținute cu markerul asociat cu gena *TaPPH*, prin urmare, apare nevoia de a stabili care variantă alelică este cea mai bună pentru îmbunătățirea grâului printr-o senescență târzie. Din aceste considerente am inițiat analize moleculare (teste) cu alți markeri SSR, precum *MAG1279* și *MAG4044*.





# Rezultate fază I

Nr. Crt.	Linie	WMC9	Barc108	Nr. Crt.	Linie	WMC9	Barc108
1	A1-5	F	F	31	A2-17	I	I
2	A1-9	I	I?	32	A2-19	F	F
3	A1-10	I	I	33	A2-20	NO	F
4	A1-16	I	I	34	A2-26	F	F
5	A1-23	I	I	35	A2-29	F	F
6	A1-24	*I DIF	*I DIF	36	A2-30	I	I
7	A1-25	F	F?	37	A2-31	I	I
8	A1-28	*I DIF	I	38	A2-34	F	F
9	A1-32	I	DIF	39	A2-35	F	?
10	A1-33	I	DIF	40	A2-36	I	I
11	A1-34	F	F	41	A2-38	F	F
12	A1-43	F	F	43	A2-44	I	I
13	A1-44	I	I	44	A2-47	F	F
14	A1-45	I	I	45	A2-49	I	I
15	A1-56	*I DIF	*I DIF	46	A2-50	I	I
16	A1-60	F	F	47	A2-51	F	F
17	A1-61	I	I	48	A2-54	F	F
18	A1-66	F	F	49	A2-56	I	I
19	A1-68	F	F	50	A2-58	F	F
20	A1-71	F	F	51	A2-69	F	F
21	A1-72	I	I	52	A2-70	F	F
22	A1-73	F	F	53	A1-70-1	F	F
23	A2-1	I	I	54	574-6	I	F
24	B1-4	F	F	55	KUKRI	NO	DIF
25	B1-6	I	I	56	DRYSDALE	DIF	F
26	B1-13	NO	F	57	B2-1	F	F
27	B1-19	I	I	58	B2-2	I	I
28	B1-28	F	F	59	B2-8	F	F
29	B2-147	I	I				
30	A2-13	F	F				
42	A2-42	I	I				

Nr	Linie	WMC9	Nr	Linie	WMC9
60	A2-78	F	86	A2-196	DIF2
61	A2-86	F	87	A2-204	F
62	A2-88	I	88	A2-208	F
63	A2-90	F	89	A2-210	F
64	A2-91	F	90	A2-215	I
65	A2-99	F	91	A2-225	F
66	A2-92	F	92	A2-229	F
67	A2-95	I	93	A2-230	F
68	A2-100	I	94	A2-233	I
69	A2-104	I	95	A2-236	F
70	A2-106	I	96	ARMURA	I
71	A2-110	F	97	BOGDANA	NO
72	A2-111	F	98	RENEANSANSA	NO
73	A2-114	I	99	ABUNDENT	F
74	A2-115	F	100	AMURG	DIF3
75	A2-118	NO	101	ARIESAN	DIF3
76	A2-120	F	102	BALTAG	DIF4
77	A2-128	F	103	GLOSA	NO
78	A2-144	F	104	MIRANDA	NO
79	A2-148	F	105	OTILIA	NO
80	A2-161	F*?	106	PITAR	NO
81	A2-175	I	107	SEMNAL	DIF4
82	A2-176	I	108	URSITA	F
83	A2-191	F	109	VOINIC	NO
84	A2-192	F	110	G603	DIF5
85	A2-194	DIF1			

**Notă:**

I- haplotip identic cu cel obținut la soiul Izvor.  
 F- haplotip identic cu cel obținut la linia F628.  
 Dif- haplotip diferit de cele obținute la soiul Izvor și linia F628.  
 NO - nu s-a obținut amplificare.

## Câmp experimental

Materialul biologic a fost semănat în perioada 10 -29 octombrie 2019. Pregătirea patului germinativ s-a efectuat din trei treceri cu discul plus o lucrare cu combinatorul, planta premergătoare -mazărea.

În ceea ce privește planul experimental pentru obținerea de noi linii de introgresie s-a stabilit următoarea schemă de hibridări:

- diferite genotipuri de grâu durum (*Triticum turgidum* cv. *durum*- genom AABB) cu diferite biotipuri de *Aegilops squarrosa*-genom DD, pentru obținerea de amfiploizi sintetici;
- diferite genotipuri de grâu durum (*Triticum turgidum* cv. *durum*-genom AABB) și genotipuri de grâu comun -hexaploid -AABBDD- *Triticum aestivum* cu *Aegilops speltoides*;
- diferite genotipuri de grâu comun cu *Triticum urartu* (genom AA).

## Rezultate fază I

În cadrul acestei faze, atenția a fost îndreptată și către analize de microscopie optică. Microscopia optică reprezintă o metodă complementară de investigare a numeroase caractere de interes pentru rezistența la diferiți factori biotici și/sau abiotici. Aceasta poate fi utilizată pentru evidențierea unor caracteristici importante ale soiurilor valoroase de grâu. În această fază au fost studiate metode pentru determinarea densității stomatelor și pentru evidențierea cuticulei, factori determinanți pentru rezistența sau toleranța la stres hidric. De asemenea, a fost consultată literatura referitoare la evidențierea conținutului și distribuției ligninei, caracter cu importanță deosebită pentru rezistență la cădere a cerealelor.

Pentru evaluarea corectă a densității stomatelor, trebuie luate în considerare mai multe aspecte: stadiul de dezvoltare al plantei, stadiul de dezvoltare al frunzei, gradul de expunere a frunzelor la lumina solară, dar și alegerea zonei din frunză ce urmează a fi investigată.

Referitor la evidențierea cuticulei, cele mai potrivite metode pentru evidențierea structurilor cuticulei ar fi cele ce utilizează albastru de Nil A și auramină. Este posibil totuși, ca datorită dezavantajelor menționate la descrierea acestor metode să nu se obțină o evidențiere foarte bună a structurilor de interes. Mai mult, optimizarea acestor metode pentru analiza probelor prelevate de la plante de grâu se poate dovedi a fi dificilă, eficiența fiecărei metode pentru evidențierea cuticulei fiind dependentă de tipul și proporția compușilor ce alcătuiesc aceste structuri.

## Concluzii

- Alela favorabilă a genei *TaPPH* - *TaPPH-7A-1* (A) a fost evidențiată în 35% dintre genotipurile analizate în această fază;
- Armura, Bogdana, G574-6, G603 și E28, genotipuri autohtone, obținute la INCDA Fundulea, prezintă varianta favorabilă *TaPPH-7A-1* (A);
- Originea variantei favorabile *TaPPH-7A-1* (A), prezentă în amfiploidul sintetic E28, obținut prin hibridarea soiului de *Triticum turgidum* cv. *durum* - Condur (AABB) cu *Aegilops tauschii* 2477 (DD), se află în soiul Condur;
- Rezultatele analizelor moleculare cu markerul *wmc9* nu au fost identice cu cele obținute cu markerul funcțional pentru gena *TaPPH*;
- Utilizarea enzimei de restricție *Hinf I* a evidențiat tot două variante alelice la nivelul locusului genei *TaPPH*;
- Rezultatele preliminare obținute în această fază nu au evidențiat noi variante alelice pentru gena *TaPPH*;
- Pentru evaluarea corectă a densității stomatelor, trebuie luate în considerare mai multe aspecte: stadiul de dezvoltare al plantei, stadiul de dezvoltare al frunzei, gradul de expunere a frunzelor la lumina solară, dar și alegerea zonei din frunză ce urmează a fi investigată;
- Pentru procesarea probelor va fi utilizată metoda care furnizează informații cât mai complete, iar în cazul în care este necesar și posibil, vor fi folosite mai multe metode complementare;
- Activitățile și obiectivele prevăzute în cadrul primei faze a proiectului s-au efectuat conform planului de realizare propus.

## PERSPECTIVE

Rezultatele obținute confirmă faptul că obiectivul fazei I/2019 și toate activitățile din planul de realizare au fost îndeplinite integral. Totodată, rezultatele evidențiază necesitatea continuării proiectului și creează premisele derulării în bune condiții a proiectului în anii următori.