




MINISTERUL AGRICULTURII  
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

## ADER 3.2.1. Faza 2/2020



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

**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

**Faza 2/2020**

**Perioada de derulare:** 01.11.2020-31.10.2020



ADER 3.2.1/2020

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.2- Dezvoltarea de metode, tehnici pentru studiul stresurilor biotice și abiotice la grâu.

Obiectivele fazei:

- Studiul variabilității genetice de la nivelul locilor genelor analoage de rezistență la stresul biotic;
- Implementarea tehnologiei de genotipare KASP („Kompetitive allele-specific PCR”);
- Optimizare metode de prelucrare a probelor pentru microscopia optică în scopul evidențierii unor caracteristici corelate cu rezistența la deficit hidric (densitatea stomatelor, cuticula ventrală și dorsală a frunzei), a distribuției ligninei la nivelul tulpinii de grâu.



ADER 3.2.1/2020

## Activitățile proiectului ADER 3.2.1, faza 2/2020

**Activitate 2.1** Analize moleculare pentru detectarea regiunilor genomice ce codifică pentru gene analoage de rezistență la stresul biotic.

**Activitate 2.2** Încercări, teste, optimizări, achiziționarea de echipamente privind implementarea tehnologiei KASP.

**Activitate 2.3** Optimizarea metodei de prelucrare a probelor pentru microscopia optică în scopul evidențierii unor caracteristici corelate cu rezistența la deficit hidric (densitatea stomatelor) a genotipurilor de grâu de interes. Procesarea materialului biologic, vizualizarea probelor la microscopul optic și prelucrarea datelor.

**Activitate 2.4** Optimizarea metodei de prelucrare a probelor pentru evidențierea cuticulei ventrale și dorsale a frunzei de grâu prin analize histochimice. Procesarea materialului biologic, vizualizarea probelor la microscopul optic și prelucrarea datelor.

**Activitate 2.5** Optimizarea metodei de procesare a probelor pentru vizualizarea distribuției ligninei la nivelul tulpinii de grâu prin metode histochimice. Procesarea materialului biologic, vizualizarea probelor la microscopul optic și prelucrarea datelor.

**Activitate 2.6** Noi hibridări cu specii înrudite cu grâul, pentru obținere de linii de introgresie și noi amfiploizi sintetici.

**Activitate 2.7** Observații fenotipice și măsurători (conținut clorofilă, MMB).

**Activitate 2.8** Diseminarea rezultatelor. Realizarea dispozitivului experimental din câmp.

## Rezultate fază II

Analize moleculare pentru detectarea regiunilor genomice ce codifică pentru gene analoage de rezistență la stresul biotic

Plantele au dezvoltat mecanisme eficiente pentru a recunoaște și a răspunde la atacul agenților patogeni. Genele analoage de rezistență („RGAs- Resistance Gene Analogs”) reprezintă candidați ai genelor de rezistență (R), ce au conservat domenii și motive care joacă roluri specifice în rezistența la atacul agenților patogeni.

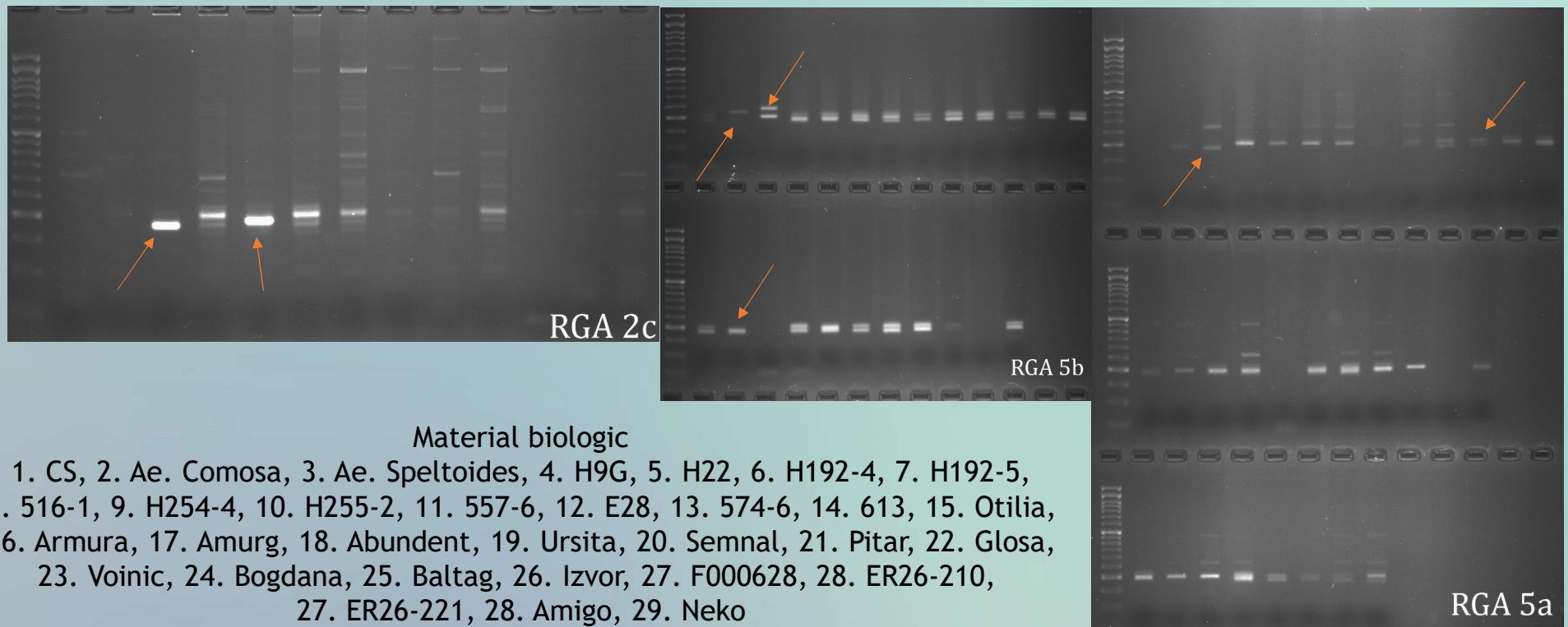
Markerii moleculari obținuți din RGA pot fi utilizați pentru maparea fină și clonarea genelor R dar și, în scopuri de ameliorare (Sekhwal și colab., 2015).

În această fază au fost testați 42 de markeri RGA iar dintre aceștia 6 nu au dat amplificare care să permită o bună vizualizare a produșilor. Analizele efectuate au permis evidențierea variabilității genetice doar în cazul a 8 markeri: RGA 2c, 5a, 5b, 13b, 14c, 18bq, 40ca, Ta5D-450 și Ta5D-450A.

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

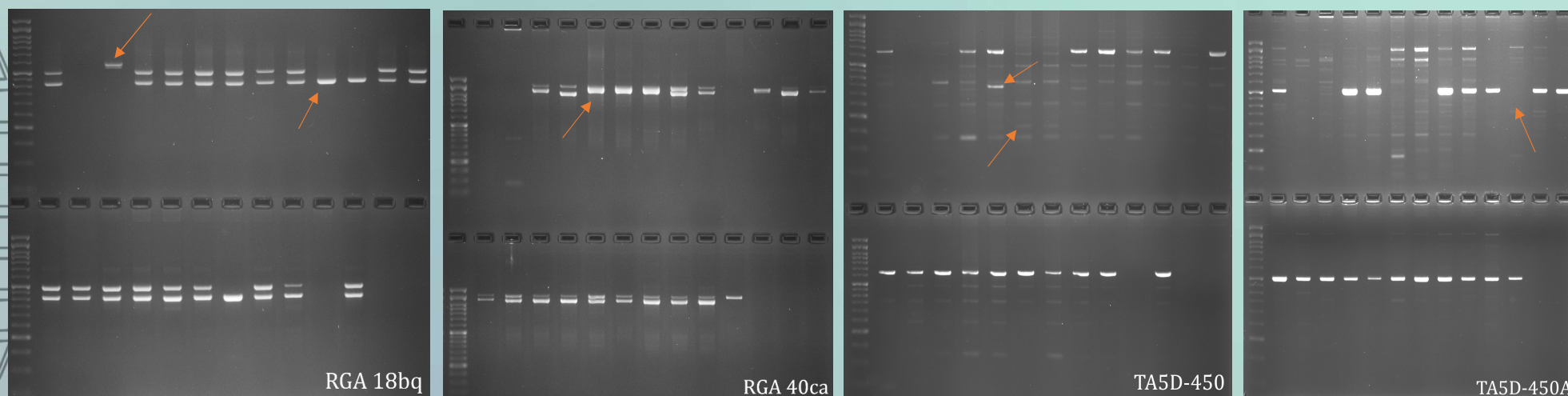
Analize moleculare pentru detectarea regiunilor genomice ce codifică pentru gene analoge de rezistență la stresul biotic



ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

Analize moleculare pentru detectarea regiunilor genomice ce codifică pentru gene analoge de rezistență la stresul biotic



Cea mai mare variabilitate genetică a fost identificată la materialul biologic obținut din încrucișări cu specii sălbatice precum:

H22 (F132/*Agropyron junceum*), H192-4 și H192-5 (*Elidur/Aegilops tauschii* 2454// Faur- spice colorate//Pitar).

Dintre cele două specii sălbatice analizate în această fază, *Aegilops speltoides* a prezentat cel mai mare polimorfism fiind o sursă bună pentru transfer de noi gene de rezistență la boli.

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

Implementarea tehnologiei de genotipare KASP („Kompetitive allele-specific PCR”)

Tehnica KASP („Kompetitive Allele-Specific PCR”) a fost propusă ca un instrument foarte promițător pentru accelerarea ameliorării culturilor (Semagn și colab., 2014) și utilizat pe scară largă pentru a valida importanța SNP-urilor (Neelam și colab., 2013).

Echipamente necesare pentru tehnica KASP: aparat sigilat plăci, termocycler, cititor plăci cu cap FRET/TFRET

Software: KlusterCaller

Componente reacție: KASP MASTER MIX + KASP primer assay+ ADN

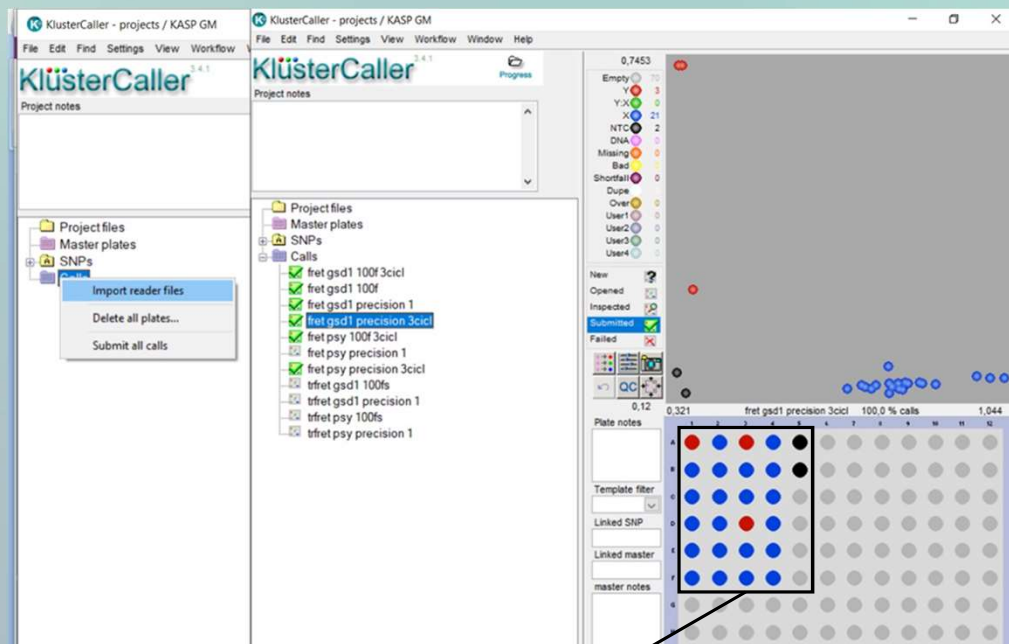




ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

Implementarea tehnologiei de genotipare KASP („Kompetitive allele-specific PCR”)



Ordinea probelor din placă și rezultatele (KASP) interpretate cu ajutorul softului KlusterCaller pentru gena TaGS-D1, implicată în controlul dimensiunilor boabelor de grâu și masa a 1000 de boabe (MMB)

A15 - D1b	CS - D1a	516-1 - D1b	Semnal - D1a	NTC (martor fără ADN)
Ariesan - D1a	Glosa - D1a	H254-4 - D1a	Pitar - D1a	NTC (martor fără ADN)
F132 - D1a	H9 - D1a	H255-2 - D1a	Voinic - D1a	
Transilvania1 - D1a	H22 - D1a	Amurg - D1b	Bogdana - D1a	
F659 - D1a	H192-4 - D1a	Abundent - D1a	Izvor - D1a	
Flamura85 - D1a	H192-5 - D1a	Ursita - D1a	F628 - D1a	

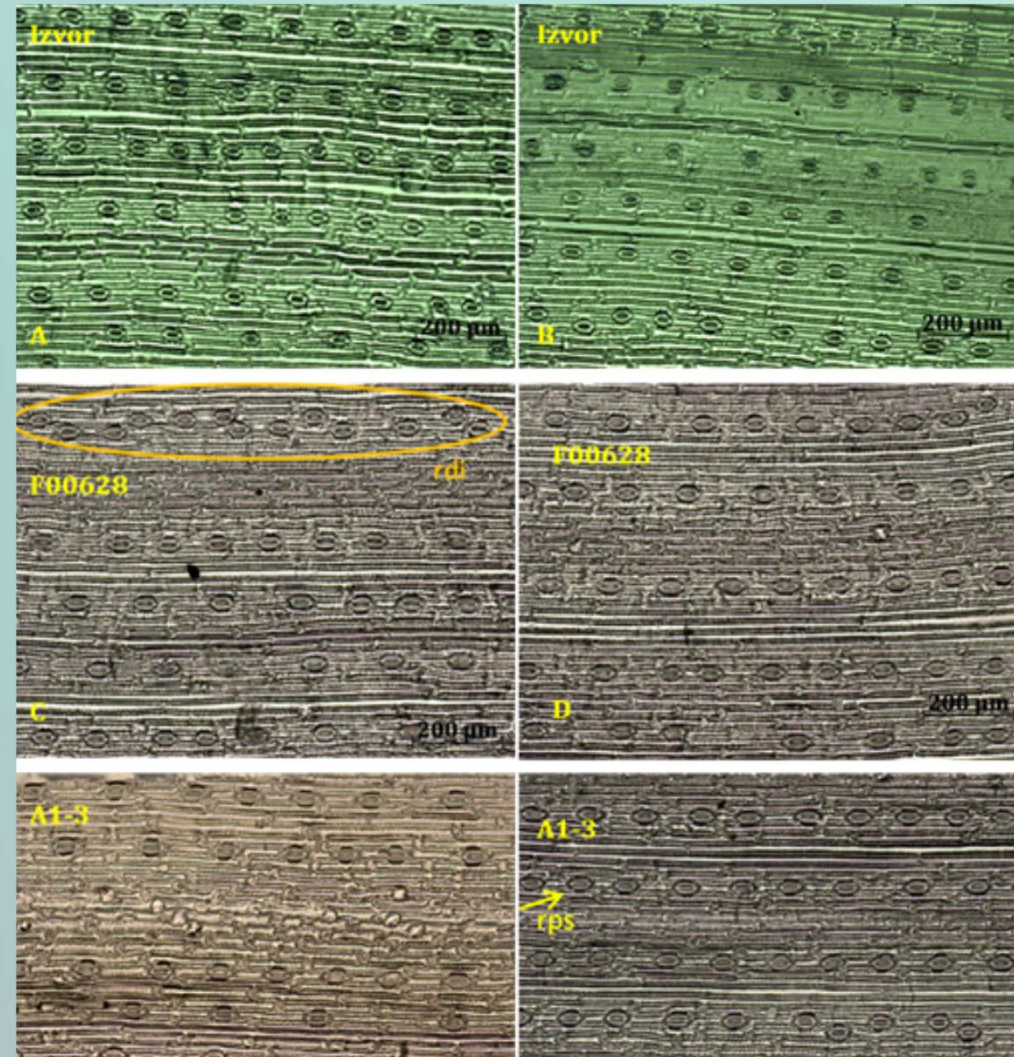
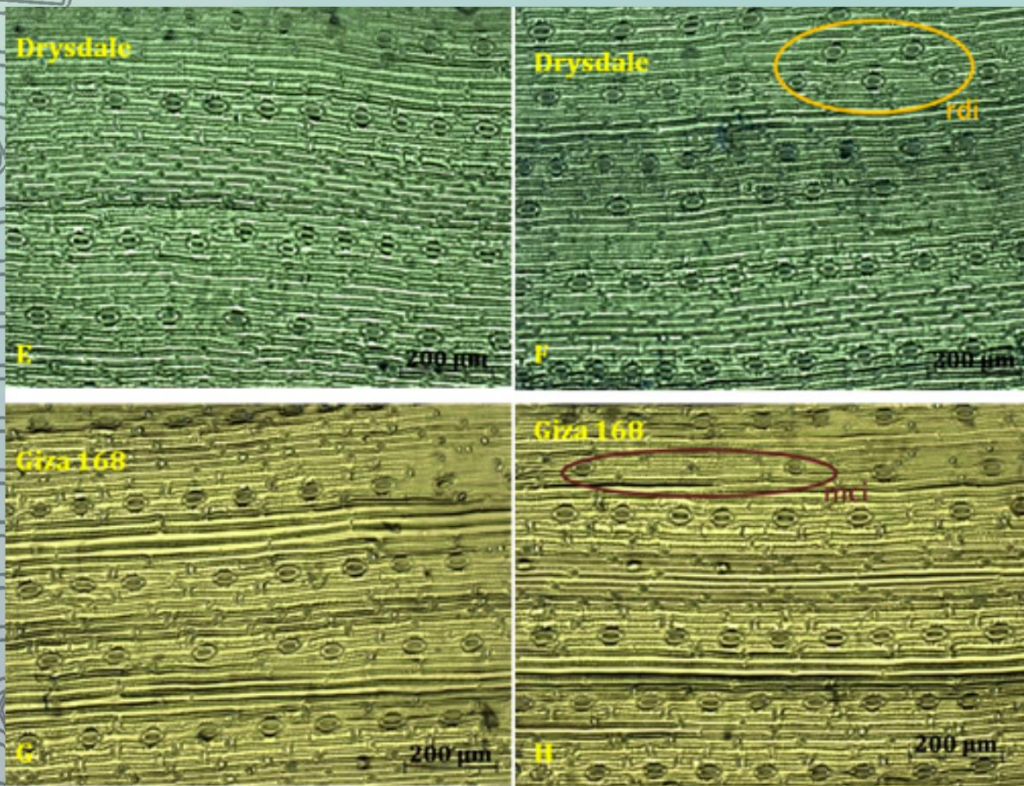
## Rezultate fază II

Optimizare metode de prelucrare a probelor pentru microscopia optică în scopul evidențierii unor caracteristici corelate cu rezistența la deficit hidric (densitatea stomatelor, cuticula ventrală și dorsală a frunzei), a distribuției ligninei la nivelul tulpinii de grâu.

### Distribuția și dimensiunea stomatelor

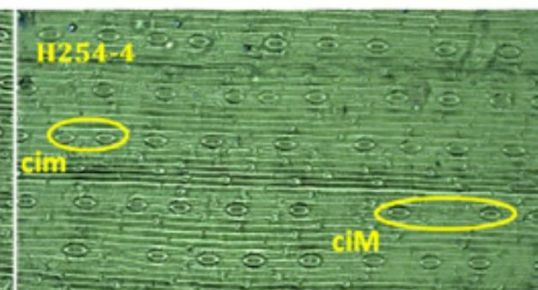
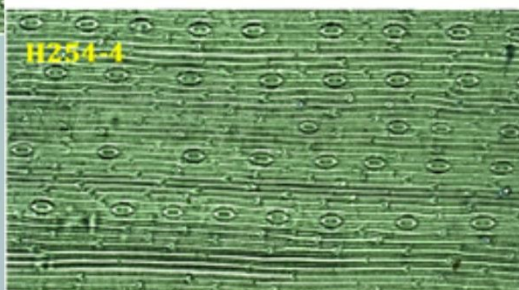
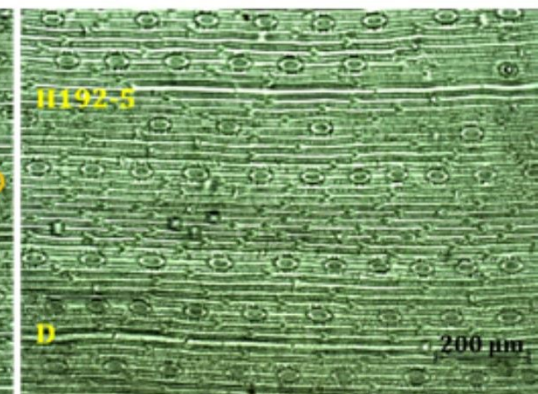
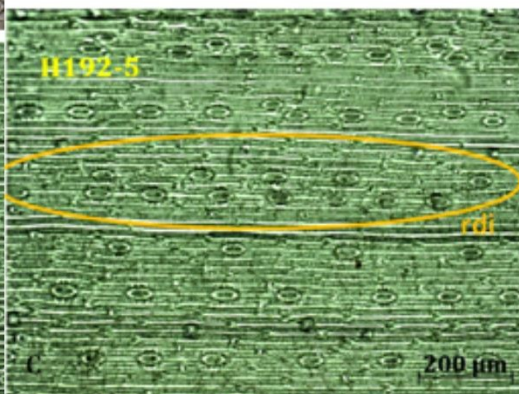
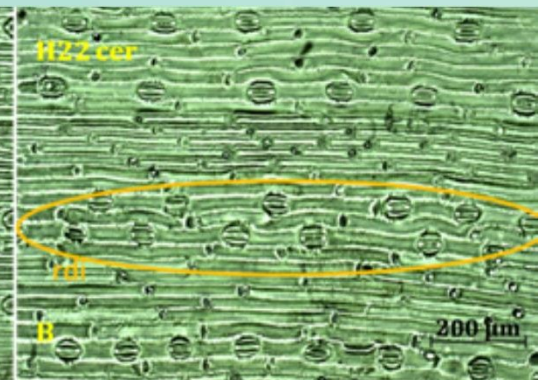
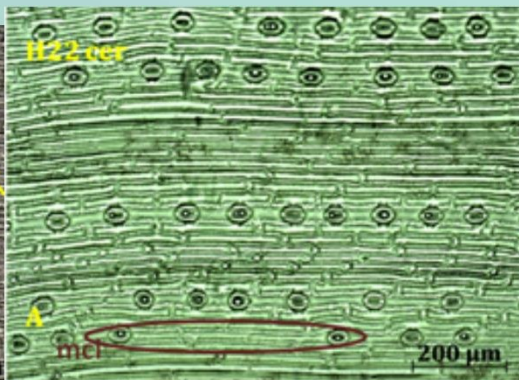
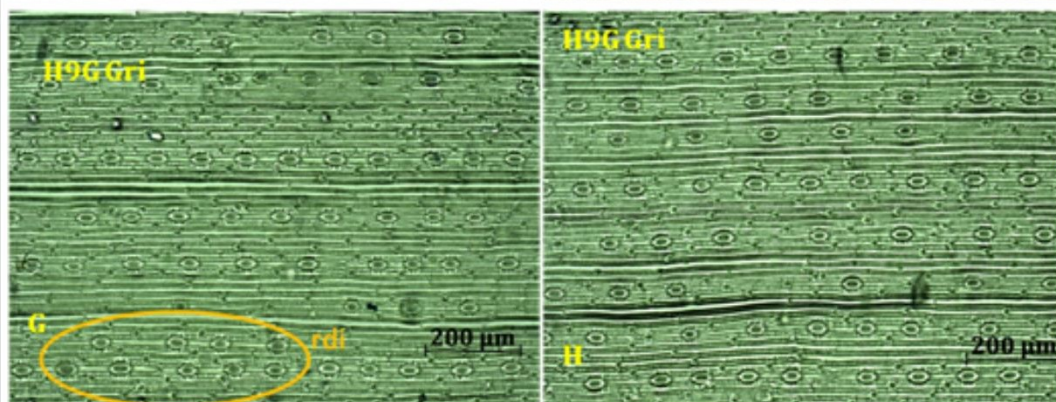
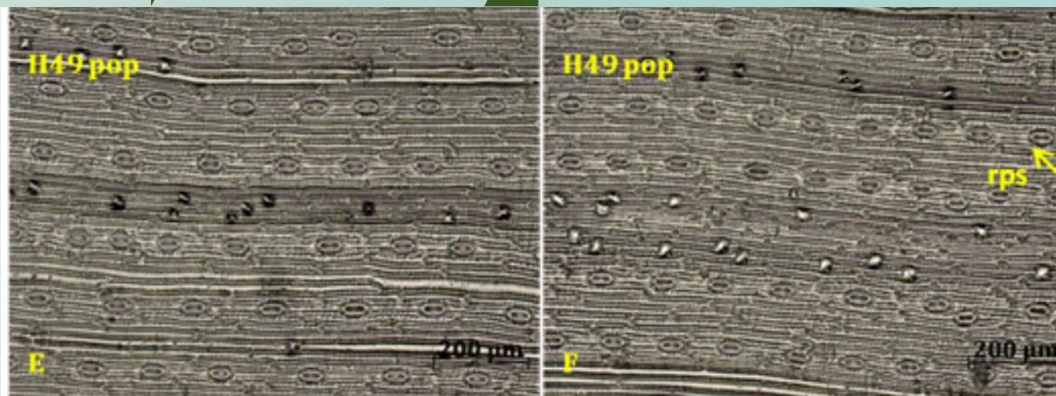
Determinarea caracteristicilor stomatelor s-a realizat prin metoda amprentării frunzelor, care constă în prelevarea amprentelor, fixarea acestora pe o lamă de microscop și vizualizarea la microscopul optic. Pentru determinarea acestor caracteristici a fost folosită frunza steag, iar amprentele au fost prelevate de pe frunze proaspete nedetașate, frunze proaspete detașate de plantă sau frunze uscate și rehidratate, fiind urmărit modul de dispunere al stomatelor și numărul stomatelor, iar numărul de stomate din fiecare fotografie a fost raportat la 1mm<sup>2</sup>. Ulterior a fost calculată valoarea medie a densității stomatelor pentru fiecare variantă, luând în calcul numărul de stomate determinat la cele două amprente.

## Rezultate fază II



Dispunerea și dimensiunile stomatelor: rps - rânduri paralele simple; rdi - rânduri duble intercalate; mci - celule interstomatice multiple

## Rezultate fază II

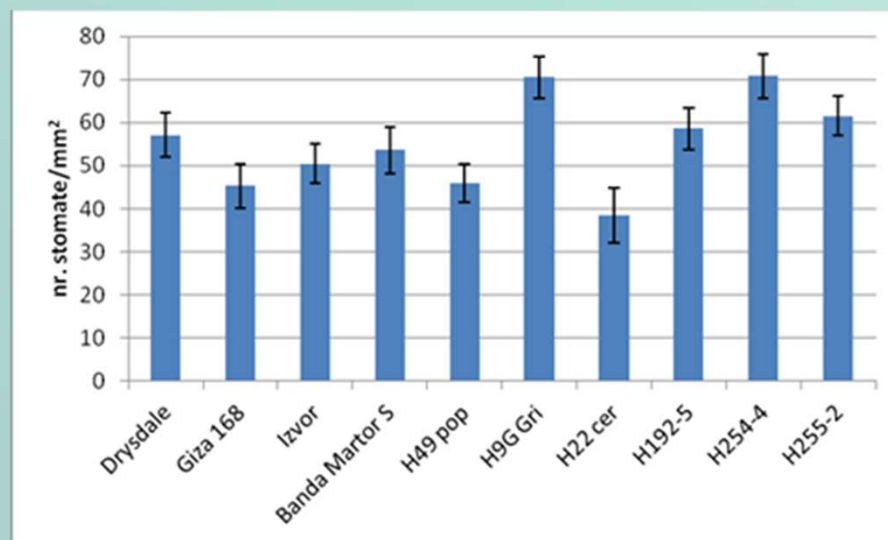
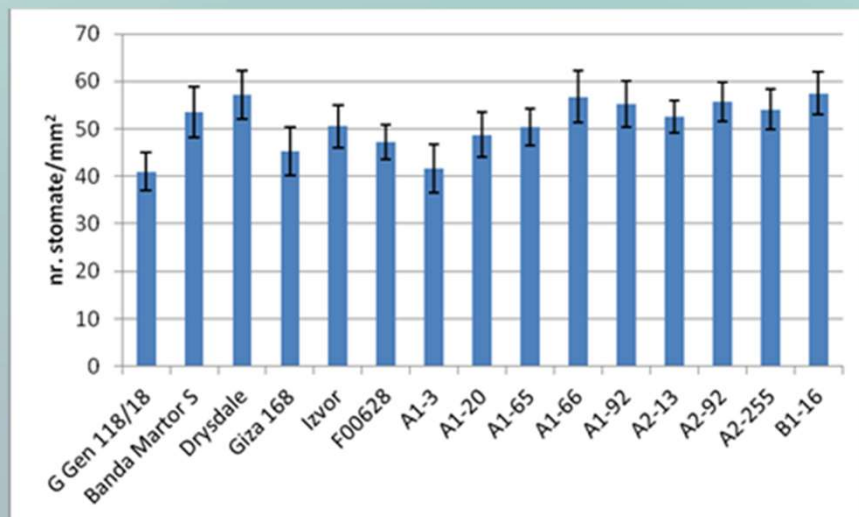


Dispunerea și dimensiunile stomatelor: rps - rânduri paralele simple; rdi - rânduri duble intercalate; mci - celule interstomatice multiple; cim - celule interstomatice de dimensiuni mici; ciM - celule interstomatice de dimensiuni mari

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

Densitatea stomatelor

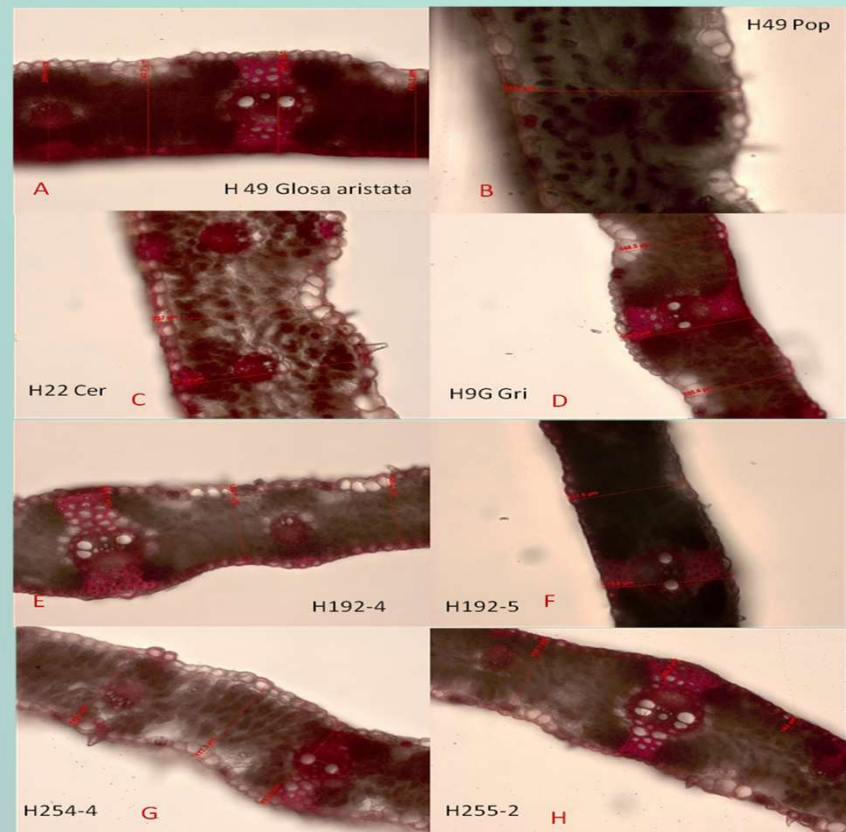
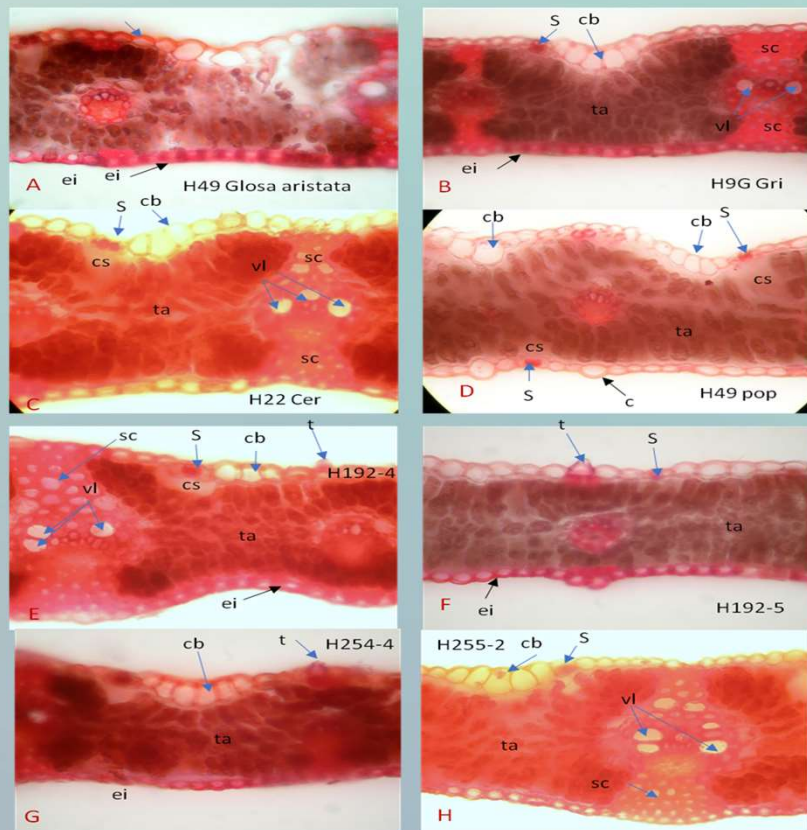


Studii recente (Dunn și colab., 2019) au arătat că plantele de grâu cu o reducere mai moderată a densității stomatale (adică o reducere cu <50% a densității stomatale pe frunze) au avut producții similare cu martorii, împreună cu o creștere a eficienței utilizării apei intrinseci. Prin urmare identificăm potențialul densității stomatale ca un instrument pentru ameliorarea grâului la stresul hidric fără pierderi de producții.

În studiul nostru s-au remarcat două probe cu densitatea stomatelor redusă: **H22 cer** (F132/Agropyron junceum (2n=28) și **A1-3** (Izvor x F00628).

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II Evidențierea cuticulei ventrale și dorsale

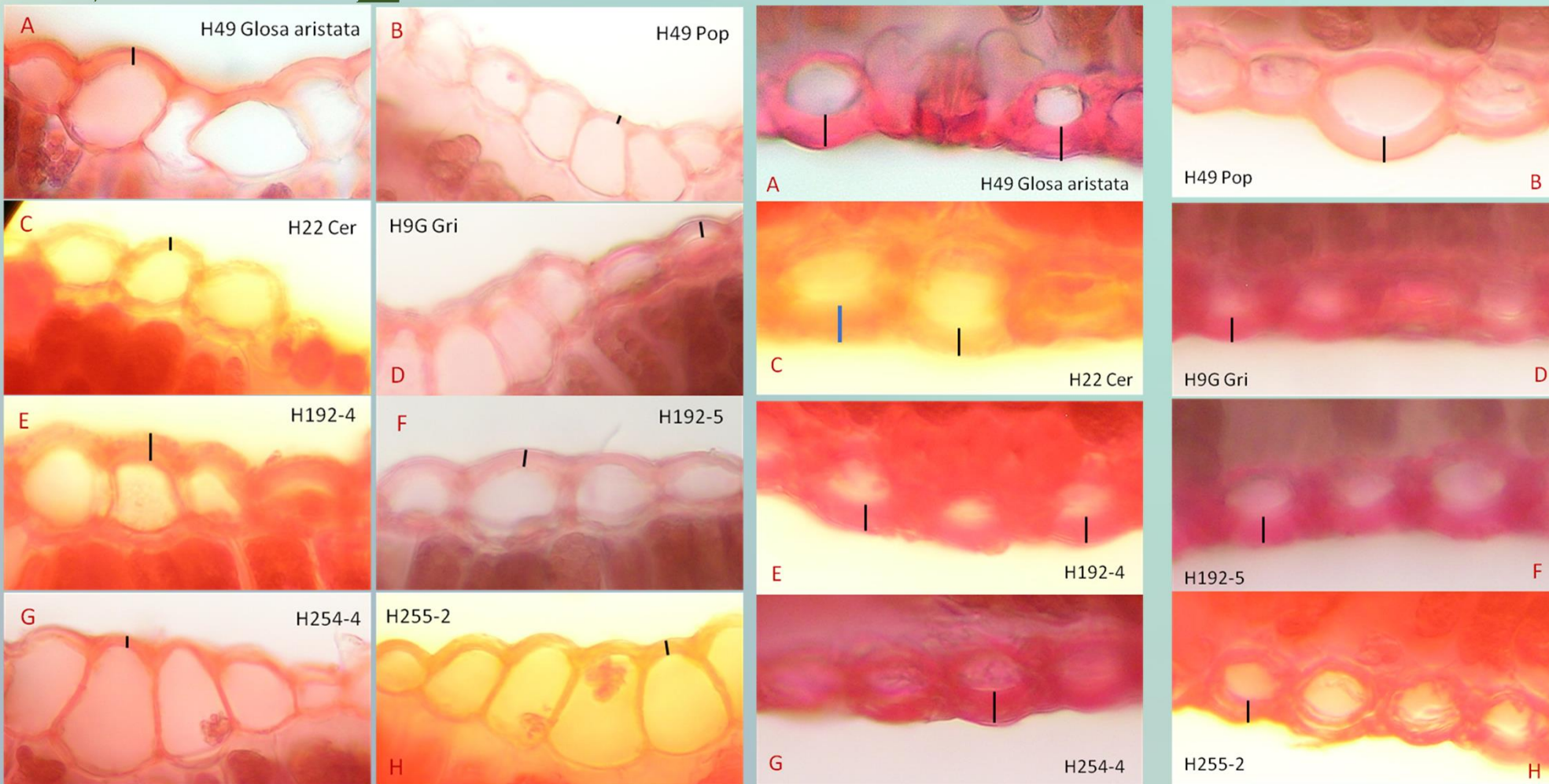


Structura limbului foliar în secțiuni transversale colorate cu safranină (mărire 400X) : celule buliforme (cb), stomate (S) cu cameră substomatică (cs), vase de lemn (vl), stâlpi de sclerenchim (sc) înconjurate de țesut asimilator (ta), cuticula (c) bine evidențiată mai ales la nivelul epidermei inferioare (ei).

Estimarea grosimii limbului foliar în secțiuni transversale prin mezofilul foliar (mărire 200X) la descendenți rezultați prin încrucișarea grâului cu specii sălbatice.

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II- Grosimea cuticulei



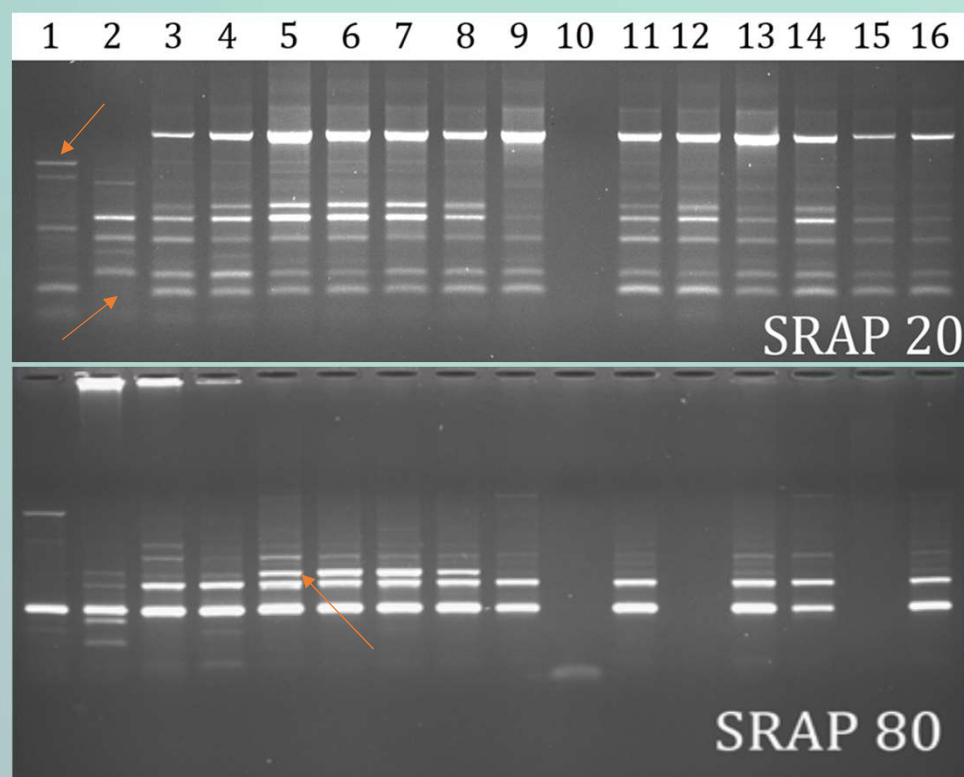
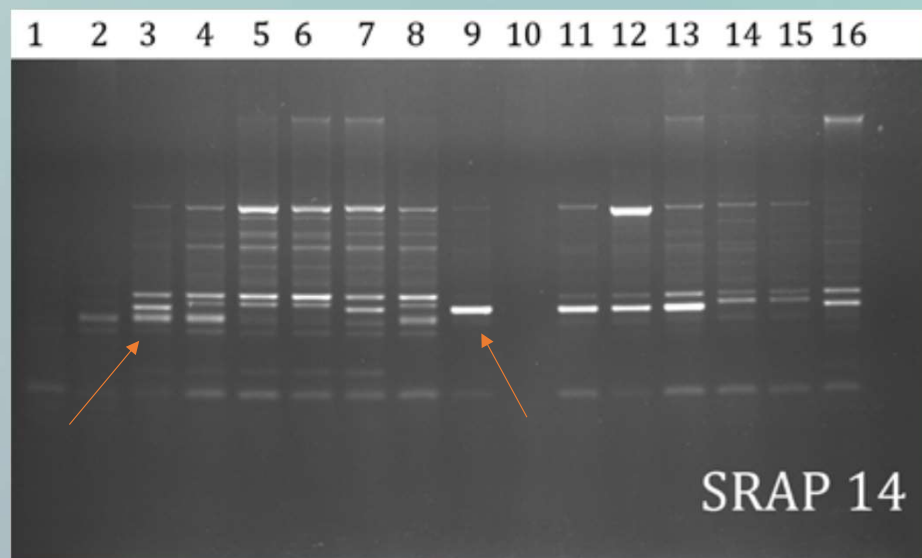
- la nivelul epidermei foliare superioare

- la nivelul epidermei foliare inferioare

ADER 3.2.1/2020

## Rezultate fază II

În această fază am inițiat analize moleculare, folosind tehnica SRAP (“Sequence-Related Amplified Polymorphism”), pentru identificarea unor loci implicați în conținutul ridicat de clorofilă. Analizele moleculare preliminare efectuate pe 16 probe cu primerii SRAP14, SRAP20, SRAP24, SRAP29, SRAP80 și SRAP95 au evidențiat variabilitate.



1. *Ae. comosa*; 2. *Ae. speltoides*; 3. H 9g gri; 4. H 22; 5. H 192 - 4; 6. H 192 - 5; 7. H 254 - 4; 8. H 255 - 5; 9. 574-6; 10. 613; 11. E28; 12. F000628; 13. Izvor; 14. Glosa; 15. Miranda; 16. B2-147



## Concluzii

- Rezultatele preliminare obținute în această fază au evidențiat variabilitate genetică pentru RGA;
- *Aegilops speltoides* și liniile H22, H192-4 și H192-5 au prezentat cel mai clar polimorfism pentru gene analoage de rezistență (RGA);
- Implementarea tehnicii KASP s-a realizat cu succes;
- Au fost evidențiate două probe cu densitatea stomatelor redusă: **H22 cer** (F132/*Agropyron junceum* ( $2n=28$ )) și **A1-3** (Izvor x F000628);
- Dintre genotipurile analizate prin metode histochimice, **s-au evidențiat variantele H192-4** (*Elidur/Aegilops tauschii* 2454// Faur- spice colorate//Pitar) și **H49 Glosa aristata**, care prezintă cea mai mare grosime a cuticulei superioare și inferioare;
- Au fost realizate noi hibridări cu specii înrudite cu grâul, pentru obținere de linii de introgresie și noi amfiploizi sintetici;
- Activitățile și obiectivele prevăzute în cadrul fazei a II-a proiectului s-au efectuat conform planului de realizare propus.

## PERSPECTIVE

- Dezvoltarea testelor KASP cu markeri funcționali la grâu;
- Continuarea analizelor pentru regiunile genomice ce codifică pentru gene analoage de rezistență la stresul biotic și posibila identificare a unor noi gene de rezistență la boli;
- Analiza stratului ceros cu ajutorul microscopiei electronice;
- Identificarea unor materiale biologice valoroase pentru programele de ameliorarea grâului și obținerea de noi soiuri performante și competitive.