

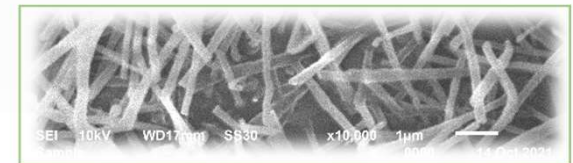
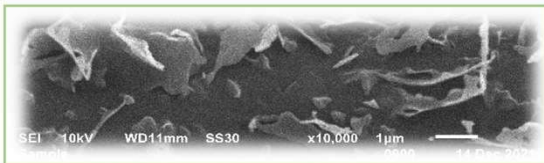


MINISTERUL AGRICULTURII
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

ADER 3.2.1. Faza 4/2022



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

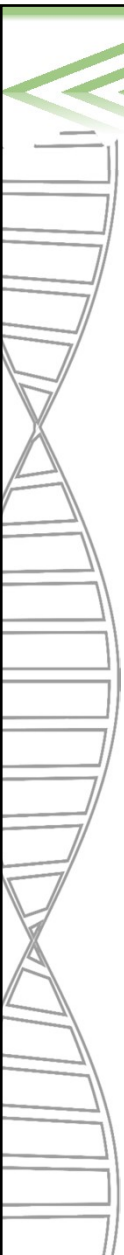
Director de proiect: Dr. Matilda Ciucă

Partener: Institutul de Biologie București al Academiei Române

Responsabil proiect: Dr. Florența-Elena Helepciuc

Faza 4/2022

Perioada de derulare: 01.11.2021-24.10.2022



ADER 3.2.1/2022

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.4 - Prelucrarea integrată a datelor din câmp și laborator (fiziologie, microscopie optică și electronică, analize moleculare - ADN) în vederea stabilirii schemei de selecție timpurie a genotipurilor valoroase de grâu.

Rezultate fază 4

Ceara cuticulară joacă un rol semnificativ în toleranța plantelor la stresul biotic și abiotic și a fost implicată în mecanismele de apărare împotriva radiațiilor ultraviolete excesive, secetă, arșiță, agenți patogeni bacterieni și fungici, insecte, salinitate ridicată, temperaturi scăzute și astfel producții mai mari în condiții de stres.

Pe de alta parte cerozitatea poate reduce cantitatea de radiatii disponibile pentru fotosinteza.

Cerozitatea se referă la aspectul cenușiu-albăstrui-argintiu al organelor plantelor de grâu (frunze, tulpini și spice).

Gene cu rol în producția de ceara (Wax): W1, W2, W3, W4, W5, Ws, QTLs

Gene inhibitoare ale producției de ceară: lw1, lw2, lw3

Aspecte din câmp



Aspecte din câmp: linia BOGDANA (GGEN3) fără strat de pruină și linia COLUMNNA (GGEN4) la care se observă pelicula de culoare alb-albăstruie, specifică caracterului ceros.

Aspecte din câmp



BII-98



H9g



H22



H49pop



H309




H297



H369

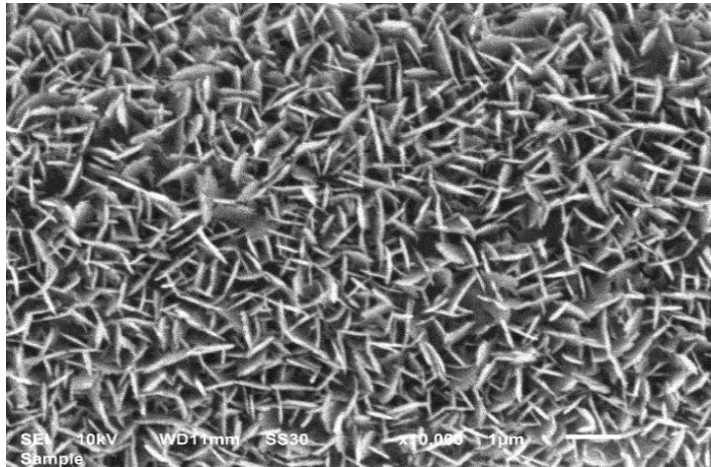


Secară Harkovskaya

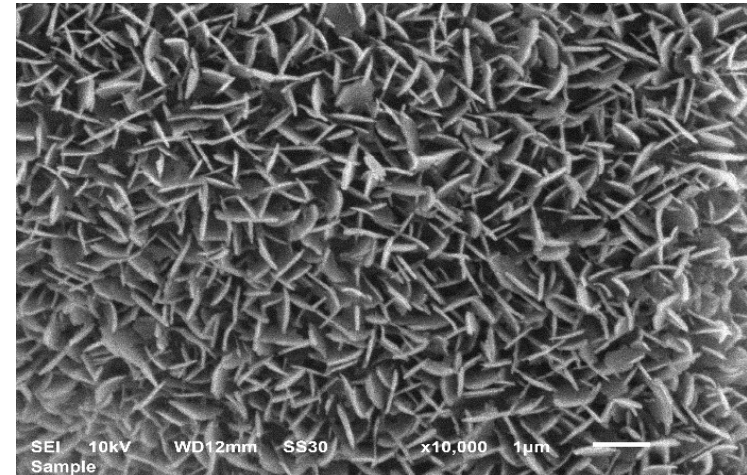
- 
- Descendențele hibrizilor cu soiul NOGAL din Franța au prezentat o mare variabilitate din punct de vedere al cerozității frunzelor. De exemplu, liniile Bogdana, Columna și 13248G4 sunt linii surori din aceeași combinație hibridă, contrastante din punct de vedere al cerozității.
 - Linia 13248G4 a segregat pentru prezenta stratului ceros, ceea ce a permis formarea a două amestecuri de linii înrudite contrastante ca cerozitate.
 - Aceste amestecuri au fost testate pe parcele în culturi comparative de orientare în mai multe stațiuni din țară. Rezultatele obținute în anul 2022 sunt preliminare. Studiul va fi continuat și în anii următori, în încercarea de a defini condițiile în care stratul ceros este avantajos în România.

Rezultate fază 4

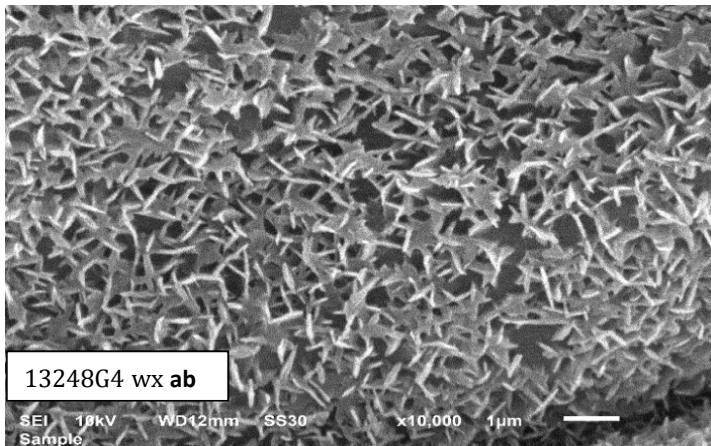
Aspectul cristalelelor de ceară la variantele 13248G4 wx și 13248G4 non-wx;
ad - suprafața adaxială, ab - suprafața abaxială (Microscopia electronică cu baleiaj (SEM))



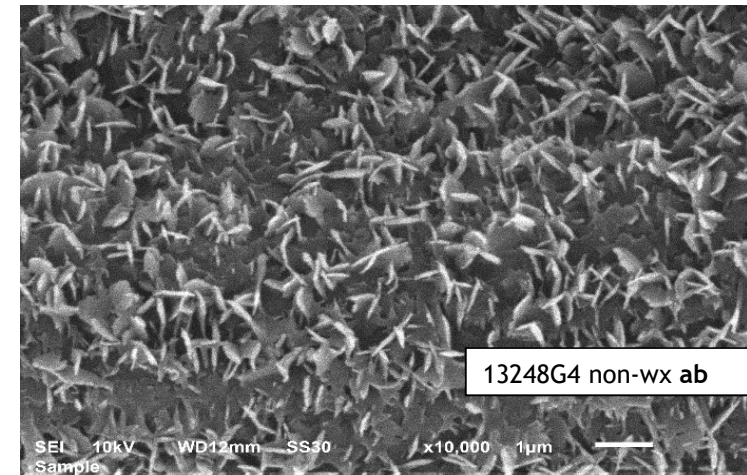
13248G4 wx ad



13248G4 non-wx ad



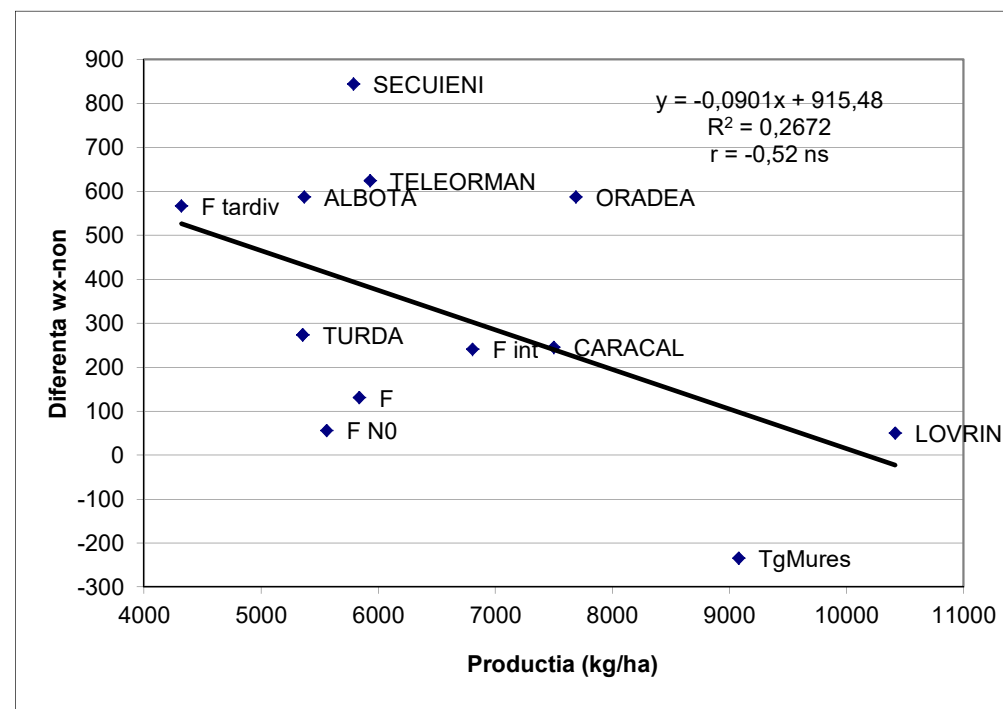
13248G4 wx ab



13248G4 non-wx ab

Producțiile de boabe la varianta cu strat ceros față de varianta fără strat ceros în 2022 (kg/ha)

Nr. Crt.	Localitate/condiții 2022	13248G4 wx	13248G4 non wx	Diferența
1	Fundulea normal	5970	5839	131
2	Fundulea N0	5615	5559	56
3	Fundulea intensiv	7047	6806	241
4	Fundulea tardiv	4887	4320	567
5	Dobrogea	5628	5354	274
6	Teleorman	6556	5932	624
7	Albota	8277	7690	587
8	Caracal	7745	7500	245
9	Lovrin	10467	10417	50
10	Oradea	5955	5368	587
11	Târgul Mureș	8846	9080	-234
12	Turda	5628	5354	274
13	Secuieni	6633	5789	844
	Med.generală	6866	6539	327
	Med.Trans-Mold	7036	6741	295
	Med.S-V	6815	6478	337

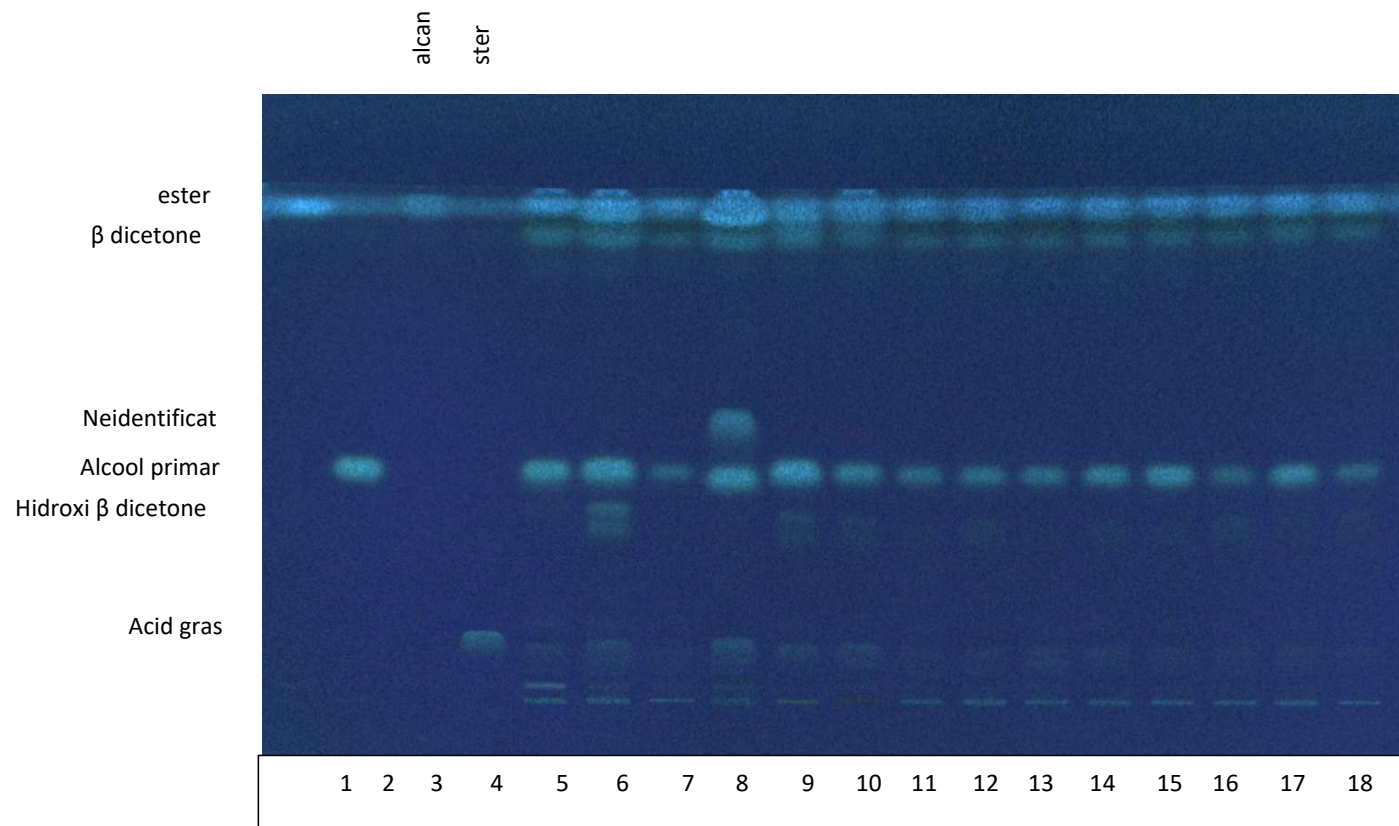


Deși corelarea cu nivelul producției nu este semnificativă, pare să existe o relație negativă între nivelul producției și avantajul dat de cerozitate. Rezultatele sugerează faptul că cerozitatea frunzelor ar avea un efect pozitiv în condiții de secetă (seceta fiind principalul factor limitativ al producției).

Rezultate fază 4 compoziția stratului de ceară

ADER 3.2.1/2022

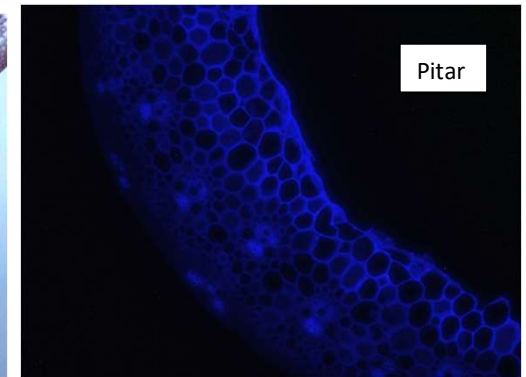
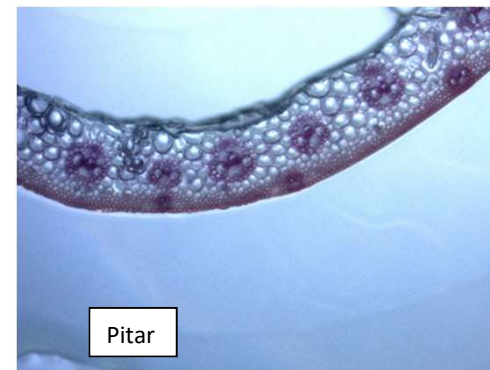
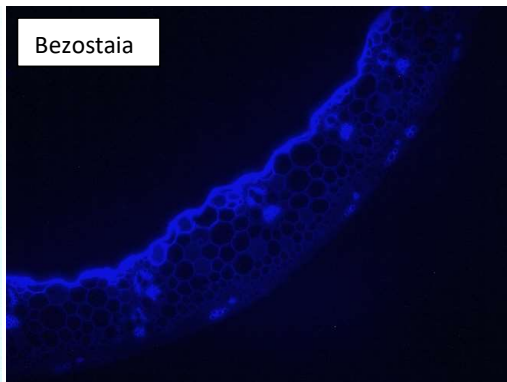
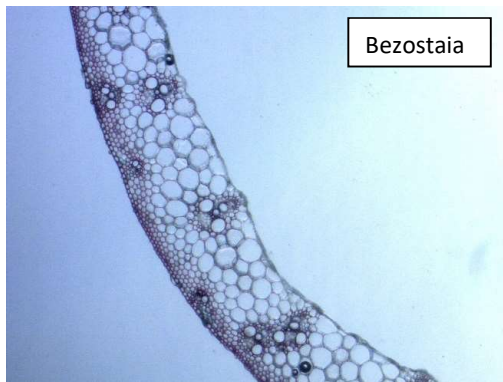
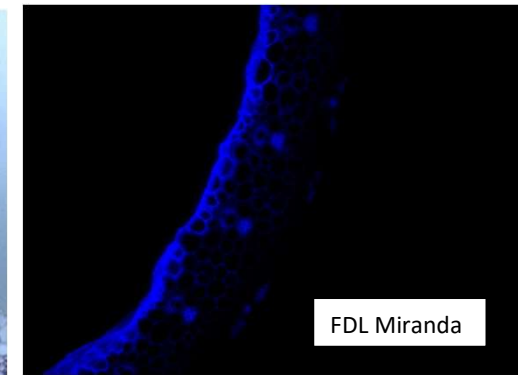
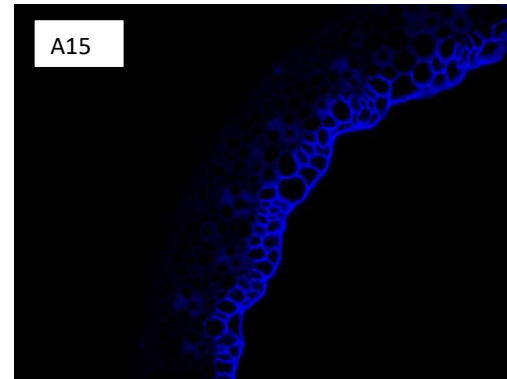
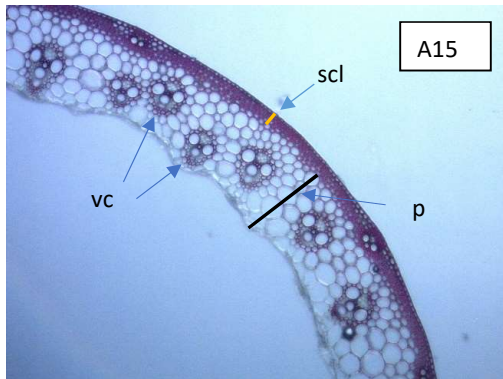
HPTLC - High Performance Thin Layer Chromatography (cromatografie în strat subțire de înaltă performanță)



Rezultate preliminare ale compoziției stratului de ceară epicuticular la 14 variante
1.Dodecyl arachidat (ester), 2.Octacosanol (alcool), 3.Tritriacontan (alcan), 4.Acid octacosanoic (acid), 5. GDR1082, 6. GFU296, 7. Drysdale, 8. Harkovskaia, 9. B2-98, 10. F628, 11. Izvor, 12. A1-3, 13. A1-65, 14.A1-66, 15.A2.13, 16. A2-92,17.A2-256, 18. B1-16

Rezultate fază 4

ADER 3.2.1/2022



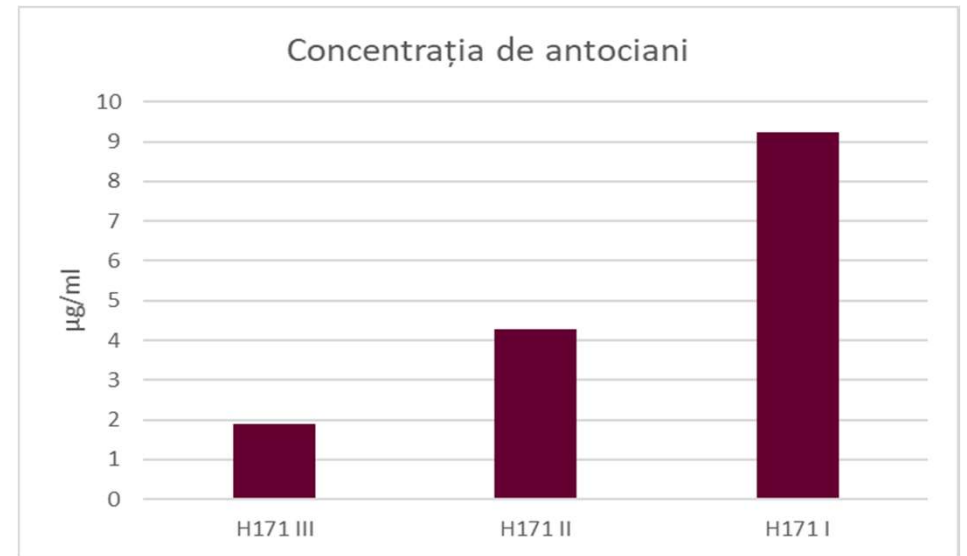
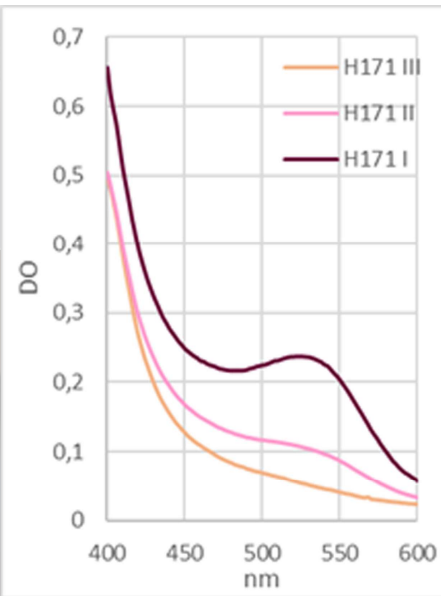
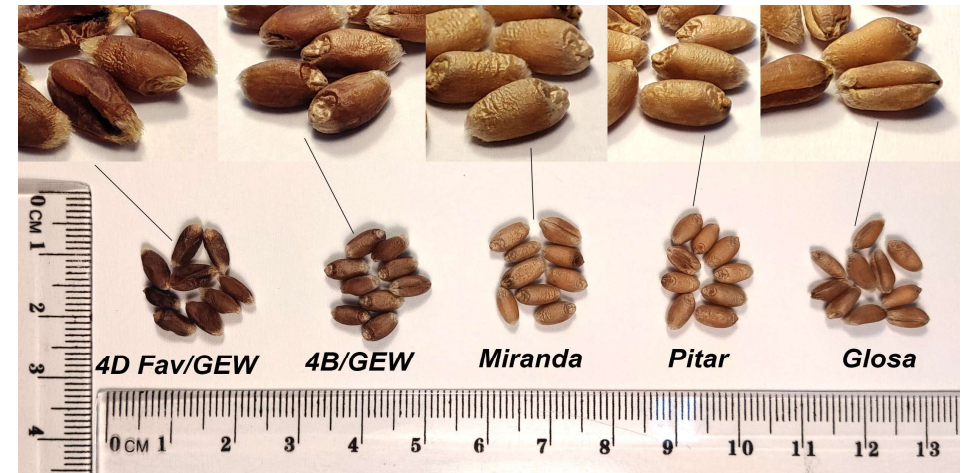
Distribuția ligninei (stânga) și celulozei (dreapta) la nivelul tulpinii de grâu; scl - sclerenchim, p - parenchim, vc - vase conducătoare evidențiate cu floroglucinol, respectiv calcoflour white. A15 și Bezostaia-sensibile la cădere; Miranda-rezistentă la cadere; Pitar -mediu rezistent la cădere
Rezultatele nu sunt concludente privind rezistența la cădere

Pericarp roșu-închis

În prezent există un interes din ce în ce mai mare pentru producția de culturi de cereale bogate în antociani, datorită varietății mari de efecte pentru sănătatea umană demonstrate de antociani (antioxidante, antiinflamatorii, anticancerigene, anti-îmbătrânire, reglarea profilului lipidic, prevenirea obezității și diabetului, hiperglicemiei și protecția retinei).

În grâul cu pericarp violet/roșu închis cele mai abundente antocianine sunt compușii pe bază de cianidine.

La INCDA Fundulea s-au obținut linii cu pericarp colorat cu participarea speciei *Thinopyrum junceum*.

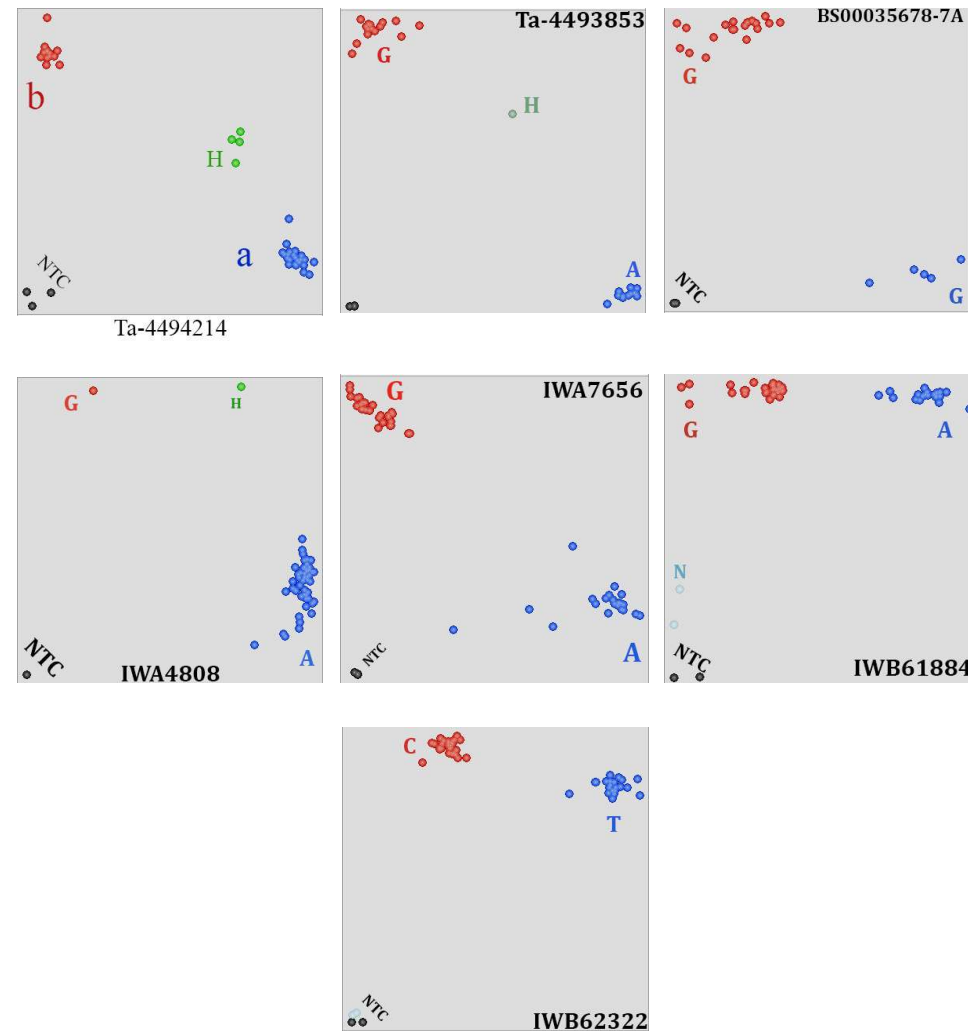


Rezultate preliminare-Concentrația de antociani la cariopse de grâu colorat H171 I, intermediar H171 II și necolorat H171 III

Linii	W1							Iw2	QTL-7A	
	Ta-4493853	Ta-4494214	Ta-3840559	IWB61884 DMP	IWB62322 DMP	IWA4808 DMC	IWA7656 DMC	Iw2-S10812-14	BS35678-7A	BS34689-7A
H22	a	a	a	b	a	a	a	iw2 (+)	b	h?
GDR 1082	b	b	b	a	b	a	b	Iw2	b	b
Drysdale	no	a	na	b	N	a	a	iw2 (+)	b	b
Kukri	a	a	na	b	N	a	a	na	b	b
Glad	a	a	a	b	a	a	a	iw2 (+)	a	b
Halberd	na	na	b	a	b	b	b	na	a	a
Bogdana	b	b	na	a	b	a	b	Iw2	b	b
Columna	a	a	b	b	a	a	a	iw2 (+)	b	b
GGEN 3	b	b	b	a	b	a	b	Iw2	b	b
GGEN 4	a	a	b	b	a	a	a	iw2 (+)	b	b
H9G	a	a	a	b	a	a	a	iw2 (+)	b	a
GGEN 33	a	a	b	b	a	a	a	iw2 (+)	b	b
GGEN 37	b	b	b	a	b	h	b	iw2 (+)	b	b
H49G	a	a	a?	b	a	a	a	Iw2	b	b
H175	b	b	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
H254	h	a	a?	b	a	a	a	Iw2	b	b
H255	b	b	b	a	b	a	a	iw2 (+)	b	b
613	a	a	a	b	a	a	a	iw2 (+)	b	b
G557-2	b	h	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
557-6	b	a	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
574-6	a	a	b	b	a	a	a	Iw2	b	b
516-1-I	a	a	b	b	a	a	na	iw2 (+)	b	b
CGF593	b	b	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
CGF595	b	b	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
GFU296	h	h	a	a	a	a	a	iw2 (+)	b	b
13248G4 wx	b	b	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b
13248G4 non-wx	b	b	b	a	b	a	b	Iw2	b	b
Secară	b	N/no	N?	N?	N	a	b	Iw2	N	a
Ursita	na	na	b	a	b	a	b	na	b	na
Izvor	b	b	na	a	b	a	b	iw2 (+)	na	na
F628	b	b	na	a	b	a	b	iw2 (+)	na	na
B2-98	b	b	b	a	b	a	b	iw2 (+)	b	b

Rezultate analize moleculare

Imagini grupare cluster tehnica KASP



Rezultate fază 4

QTL-uri implicate în sinteza de ceară cu localizare pe cromozomul 7A

- QTL-ul reprezentat de SNP-ul BS00035678 nu a fost observat în materialele românești analizate ci doar în două soiuri străine, Gladius și Halberd.
- QTL-ul detectat cu ajutorul SNP-lui BS0034689 nu este prezent în soiurile românești analizate ci doar în linia H9G și în secara.

Rezultatele obținute scot în evidență *rolul locusului lw2*, fiind singurul care face distincție clară între prezența stratului de ceară sau absența acestuia. Cantitatea de ceară și compoziția chimică a acesteia este influențată de interacțiunea dintre locii implicați în sinteza/inhibarea sintezei stratului de ceară.

Rezultate fază 4

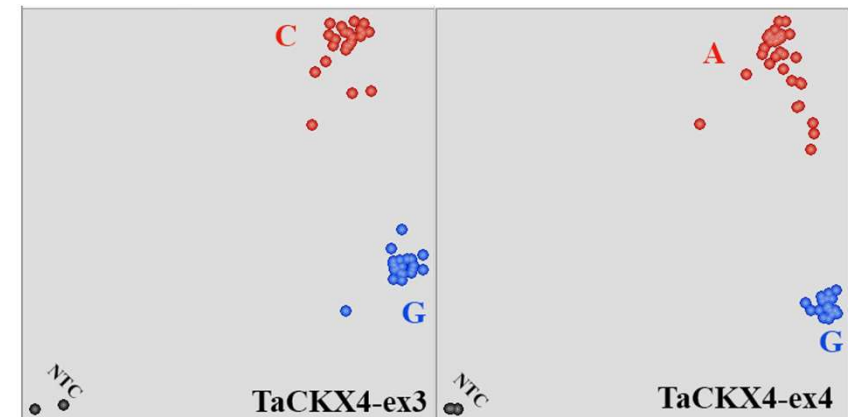
ADER 3.2.1/2022

Tackx este o genă implicată în controlul nivelului de citokinină. Enzimele citokinin oxidază/dehidrogenază (CKX) catalizează degradarea permanentă a citokininelor, fitohormoni ce joacă un rol crucial în reglarea proliferării și diferențierii celulelor plantelor și, de asemenea, controlează diferite procese în creșterea și dezvoltarea plantelor, cum ar fi senescența, ramificarea rădăcinilor, transducția semnalelor nutriționale, formarea cloroplastelor și productivitatea culturilor. Gena *Tackx4* are efect și asupra conținutului și stabilității clorofilei din frunze, MMB și producție

Haplotipurile genei *Tackx4* și diferențele fenotipice

<i>TaCKX4</i>	L (mm)	l (mm)	FFD	MMB (g)
A	6,59	3,25	1,85	39,6
C	6,20	3,16	1,81	35,4
Diferenta	0,4	0,1	0,0	4,2
<i>p</i>	0,035	0,117	0,493	0,005

Rezultatele moleculare obținute cu markerii KASP *TaCKX4*-ex3 și *TaCKX4*-ex4 au arătat că varianta favorabilă este cea de tip A (SNP C + SNP G) și de asemenea, din punct de vedere statistic (software TASSEL - General Linear Model), varianta A a fost semnificativ asociată cu lungimea boabelor ($p < 0,05$) și MMB ($p < 0,01$).



Evidențierea prin tehnica KASP a variantelor alelice ale genei *Tackx4*
(NTC = No Template Control = probă martor fără ADN matriță)

Rezultate fază 4

ADER 3.2.1/2022

Analize cu markeri pentru RGAs (Resistance Gene Analogs) urmată de secvențiere a evidențiat în varietăți de *Aegilops speltoides* (22-2 și 125) similaritate a secvenței cu cea ce codifică pentru proteină de rezistență la boli asemănătoare cu proteina RPM1, cu markerul RGA-40C.

Secvența *Aegilops speltoides* (22-2 și 125):

```
CAGTGTAATGACAGTCCGAAGTTGGTGCATATTGGAAAATGGTTGCTCAATATCCCTCTTTAGTTTGTGAAGCAC  
CAACCGACGTCCATTCATCTCAAGAGACCCCCACACTGATCCTCATAACTAACACCAAACAGTTCTTCTTGCAC  
AAATCAACTGCCAGTTCACGTACGAGATCGTGCATTTTGAATTTCTTCATCCGACCAAATGAGTTTCTCTCAACAA  
GTTGCAGCATGTTTCTGTCAACCAACTCTTTTAGATAGCATTCTGCCACTACTTCTAGT
```

Concluzii

ADER 3.2.1/2022

- Dezvoltarea a doi markeri KASP pentru SNP-uri la nivelul *TaCKX4A* exon3 și *TaCKX4A* exon4 a condus la evidențierea a trei haplotipuri: GA, CG și CA (doar în 4 genotipuri).
- Rezultatele moleculare obținute cu markerii KASP *TaCKX4-ex3* și *TaCKX4-ex4* au arătat că varianta favorabilă este cea de tip A (SNP C + SNP G) și de asemenea, din punct de vedere statistic varianta A a fost semnificativ asociată cu lungimea boabelor ($p < 0,05$) și MMB ($p < 0,01$).
- Testarea a două amestecuri (cerat și necerat) în 13 zone de cultură a grâului a arătat faptul că deși corelția cu nivelul producției nu este semnificativă pare să existe o relație negativă între nivelul producției și avantajul dat de cerositate. Cum principalul factor limitativ al producției se poate spune că a fost seceta, ar părea că cerositatea a fost avantajoasă mai ales în condiții de secetă.
- S-a realizat caracterizarea moleculară a unui sortiment de linii și soiuri de grâu autohtone privind variabilitatea genetică de la nivelul unor loci implicați în sinteza stratului ceros de la nivel epicuticular, a unor loci implicați în senescență și a unor loci implicați în conținut de clorofilă și „stay-green”.
- Dintre genotipurile analizate, cu privire la conținutul de ceară, se remarcă următoarele două: B2-98 și H9G (*Triticum dicoccoides/Aegilops ventricosa*/ /607-3) cu peste 16mg ceară.
- Analize privind compoziția stratului de ceară au evidențiat că acidul gras (acid octacosanoic) este prezent doar la variantele GFU 296, secara Harkovskaia, B2-98 și F628.
- Evidențierea locusului IW2-2D cu ajutorul markerilor moleculari în germoplasma de grâu distinge clar genotipurile cerate de cele necerate din acest studiu.

Concluzii

ADER 3.2.1/2022

- Evidențierea unei noi variante alelice pentru rezistență la boli în liniile 613 (F132*3/Aegilops comosa), H22 (F132/Agropyron junceum) și în varietăți de Aegilops speltoides (21-1, 22-2, 125) prin analiza RGA („Resistance Gene Analogs”) și secvențiere.
- Selecția a peste 300 elite grâu cu pericarp colorat (violaceu/roșu închis/”purple”) pentru calitate.
- În baza rezultatelor cu privire la conținutul în ceară, forma cristalelor și a compoziției stratului de ceară, a conținutului în clorofilă și a rezultatelor moleculare au fost realizate mai multe hibridări între B2-98, H9Ggri și alte materiale (amfiploizi sintetici și soiuri moderne).
- Linia B2-98 se află deja în programul de ameliorare a grâului.
- Celelalte linii evidențiate cu potențial de toleranță/rezistență la factorii de stres și cele pentru îmbunătățirea calității grâului, deoarece se află încă în segregare nu au fost predate la laboratorul de ameliorare a grâului ci sunt sub observația echipei proiectului pentru selecții viitoare a materialelor homozigote.
- Aceste rezultate deschid noi perspective de ameliorare a grâului pe baza trăsăturilor adaptative iar cercetările privind aceste trăsături ar trebui continuate.