



MINISTERUL AGRICULTURII
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE



ADER 311

Faza I - 2023

Cercetări privind utilizarea markerilor moleculari pentru crearea și promovarea în producție a unor soiuri de grâu cu rezistență genetică la bolile criptogamice



ADER 311 (2023-2026)

Proiect finanțat prin: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale

Tip proiect: Plan Sectorial 2023-2026 - ADER 2026

Acronim proiect: ADER 3.1.1.

Contract nr.: 311/17.07.2023

Autoritatea Contractantă: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, Planul sectorial pentru cercetare-dezvoltare din domeniul agricol și de dezvoltare rurală pe anii 2023-2026, "Agricultură și Dezvoltare Rurală - ADER 2026"

CONSORTIU PROIECT

Contractor: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea (Director de proiect: Dr. Daniel CRISTINA)

Partener 1: Universitatea pentru Științele Vieții "Ion Ionescu de la Brad" din Iași (Responsabil proiect: Dr. Iulian GABUR)

Partener 2: Institutul de Biologie București al Academiei Române (Responsabil proiect: Dr. Florența- Elena HELEPCIUC)

Partener 3: Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București (Responsabil proiect: Dr. Mihaela IORDĂCHESCU)

Faza 1/2023

Perioada de derulare: 17.07.2023-30.10.2023

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 (3.1): Dezvoltarea cercetărilor de genetică, genetică moleculară, genomică și proteomică, pentru deschiderea de noi orizonturi în ameliorare.

DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ

Faza nr. I - Inițierea unor studii privind rezistența genetică a grâului la principalele boli fungice.

Termen fază: 17.07.2023 - 30.10.2023.

Obiectivul fazei: Îmbunătățirea metodologiei de testare, validare și selecție a germoplasmei de grâu de toamnă cu însușiri superioare pentru minimizarea impactului bolilor criptogamice (rugini).

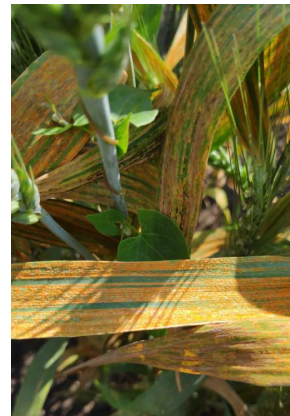
Activitățile proiectului ADER 3.1.1, Faza 1/2023

- ✓ **Activitate 1.1.** Documentare și achiziționarea de echipamente și reactivi pentru realizarea experimentelor (CP, P2).
- ✓ **Activitate 1.2.** Analize moleculare pentru detectarea prezenței/absenței unor regiuni genomice implicate în rezistența grâului la rugina galbenă, brună și neagră în 90 de linii derivate din grâu x *Thinopyrum* (CP).
- ✓ **Activitate 1.3.** Selectarea metodelor de investigare (biochimice și de microscopie) potrivite în funcție de modul de acțiune al patogenului studiat (P2).
- ✓ **Activitate 1.4.** Realizarea dispozitivului experimental pentru testarea materialului biologic și întocmirea planului experimental și de hibridare pentru obținerea de noi linii de introgresie (CP).

Bolile criptogamice (bolile fungice) precum **ruginile**, **septorioza** (pătarea frunzelor) și **mălura** reprezintă o amenințare semnificativă pentru producția de grâu, având un impact negativ asupra producției și calității recoltei, impact ce poate varia în funcție de mai mulți factori, cum ar fi condițiile meteorologice, rasele de patogeni, practicile agricole și nivelul de rezistență genetică al soiurilor de grâu cultivate.

Rezistența la bolile fungice reprezintă o provocare continuă pentru cercetători și amelioratori. Modelele de virulență unice și complexe, evoluția continuă ce conduce la învingerea/depășirea rezistenței genetice în soiuri, schimbările în dinamica populației, migrația transfrontalieră au dus la epidemii localizate/regionale care duc la amenințări la adresa securității alimentare. Acest lucru subliniază necesitatea de a identifica, caracteriza și utiliza gene eficiente de rezistență la rugini, septorioză și mălură din diverse surse în liniile de pre-ameliorare și ulterior în viitoarele soiuri de grâu.

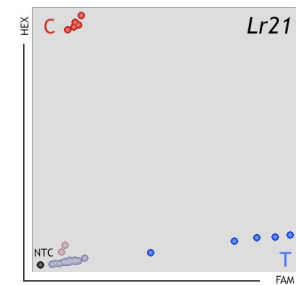
Utilizarea rezistenței genetice și introducerea genelor de rezistență la mai multe rase specifice, cu efect pleiotrop și la nivel de plantă adultă, în linii de grâu, pot îmbunătăți durabilitatea rezistenței.



Rezultate moleculare - rugina brună

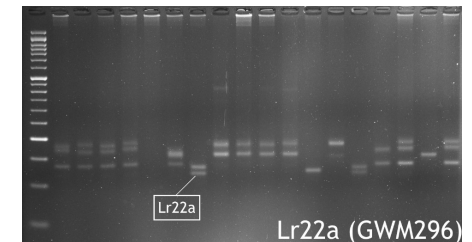
Până în prezent au fost descoperite peste 80 de gene de rezistență la rugina brună. În cadrul acestei faze au fost efectuate reacții pentru evidențierea prezenței genelor *Lr21*, *Lr22a*, *Lr24* (*SR24*), *Lr32*, *Lr34* (*Yr18-Sr57-Pm18*), *Lr39*, *Lr46* (*Yr29-Sr58-Pm39*) și *Lr47*.

Gena *Lr21* este localizată pe cromozomul 1DS și este o gena ce conferă rezistență la planta adultă (APR). Evidențierea prezenței acestei gene s-a realizat prin tehnica KASP cu markerul de tip SNP (Single Nucleotide Polymorphism) *Lr21* GQ504819-1346-C/T. Varianta alelică ce indică rezistența este SNP C. Analizele efectuate pe materialul biologic format din 98 linii derivate din grâu x *Thinopyrum* nu au evidențiat prezența variantei alelice favorabile de la nivelul locusului *Lr21*. Cu toate acestea, analizele au evidențiat prezența alelei favorabile în 10 din cei 29 de amfiploizi sintetici analizați. Prin urmare, cei 10 amfiploizi pot fi utilizați ca posibilă sursa pentru această genă.



Evidențierea prezenței genei *Lr21* prin tehnica KASP (NTC = No Template Control; C = varianta favorabila)

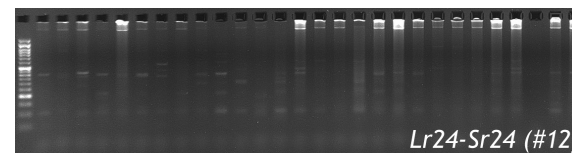
Gena *Lr22a* are ca origine specia înrudita cu grâul *Aegilops tauschii* (sinonim cu *Aegilops squarrosa*, *Triticum tauschii*). Gena este localizată pe cromozomul 2D și conferă rezistență la plantulă (SR). Evidențierea haplotipurilor acestei gene s-a realizat cu ajutorul markerului GWM296 (temperatura de prindere a primerului = 61°C). Amplificarea ADN s-a realizat cu kitul DreamTaq Green PCR Master Mix 2x, într-un volum final de reacție de 15μl (1x master mix, 0.4mM primeri, 70-90ng ADN). Separarea produșilor PCR s-a realizat pe gel de agaroză „high resolution” de concentrație 3%. Varianta favorabilă pentru acest locus este evidențiată de prezența a doua fragmente de 121+131pb. Rezultatele obținute au evidențiat prezența genei *Lr22a* doar în doi amfiploizi sintetici, respectiv E16A și E22A.



Profilul electroforetic obținut cu markerul GWM296 pentru evidențierea prezenței genei *Lr22a*

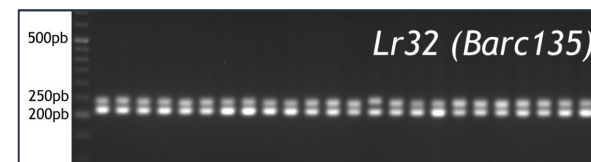
Rezultate moleculare - rugina brună

Gena *Lr24* cu originea în *Agropyron elongatum*, este localizată pe cromozomul 3DL și conferă rezistență la plantulă. Gena *Lr24* este înălțuită cu gena *Sr24* ce conferă rezistență la unele rase ce produc rugina neagră. Amplificarea ADN în cazul acestei gene, cu markerul SR24#12, nu a condus la obținerea unor profile electroforetice corespunzătoare. Prin urmare această reacție va fi repetată, fiind necesare optimizări la parametri de amplificare și/sau componentele din reacție.



Profilul electroforetic obținut cu markerul SR24 #12

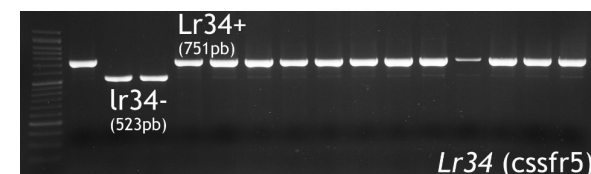
Gena *Lr32* este o genă transferată din *Aegilops tauschii* pe cromozomul 3DS din grâu ce conferă rezistență la planta adultă. Analizele efectuate pe 98 linii nu au evidențiat prezența acestei gene, respectiv produsul de 273pb, în materialul analizat.



Profilul electroforetic obținut cu markerul Barc 135

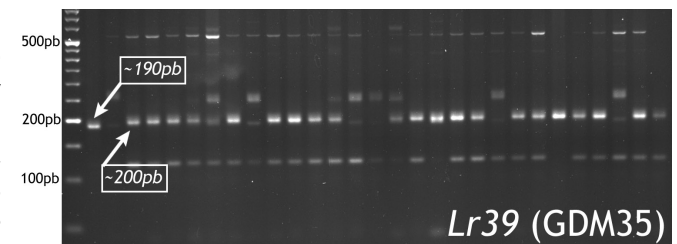
Gena *Lr34* (*Yr18-Sr57-Pm18*) este localizată pe cromozomul 7DS și conferă rezistență la rugina brună la planta adultă. De asemenea, *Lr34* conferă rezistență și la rugina galbenă (*Yr18*), rugina neagră (*Sr57*) și făinare (*Pm18*).

Amplificarea ADN cu markerul *cssfr5* (annealing 62°C) s-a realizat cu kitul KAPA2G Fast Multiplex PCR într-un volum final de 10μl (1x master mix, 0.2mM fiecare primer, 70-90ng ADN). Separarea produsilor PCR s-a realizat pe gel de agaroză routine use de 1.5%. Alela de rezistență a genei *Lr34* este evidențiată de fragmentul de 751pb iar alela de sensibilitate de fragmentul de 523pb. Rezultatele moleculare au evidențiat prezența alelei de rezistență a genei *Lr34* în 86 de linii din cele 98 analizate (87,7%).

Profilul electroforetic obținut cu markerul *cssfr5*

Rezultate moleculare - rugina brună

Gena *Lr39* a fost transferată din *Aegilops tauschii* și este localizată pe cromozomul 2DS. Gena conferă rezistență în toate etapele de creștere a plantelor (ASR - All Stage Resistance). Evidențierea haplotipurilor acestei gene s-a realizat cu markerul GDM35 (temperatura de prindere a primerului = 55°C). Amplificarea ADN s-a realizat cu kitul DreamTaq Green PCR Master Mix 2x, într-un volum final de reacție de 15μl (1x master mix, 0.4mM primers, 70-90ng ADN). Separarea produșilor PCR s-a realizat pe gel de agaroză high resolution 3%. Alela de rezistență a genei *Lr39*, evidențiată de produsul PCR de ~185-190pb, a fost observată doar în cazul amfiploidului **E22A**. Cu toate acestea, în cazul a 50 din cele 98 de linii, s-a observat un produs PCR de aproape 200pb, produs ce ar putea reprezenta o altă variantă alelică a genei *Lr39* cu posibilă origine în sursa de *Thinopyrum*. Studii ulterioare de infecții artificiale vor aduce mai multe informații privind contribuția acestei variante alelice.

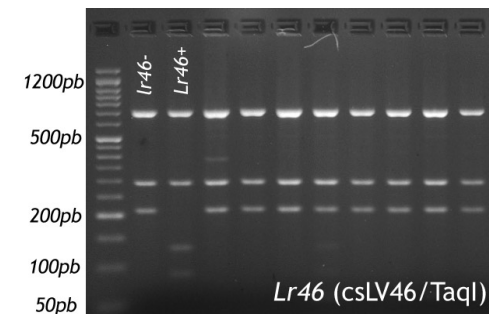


Profilul electroforetic obținut cu markerul GDM35

Gena *Lr46* (*Yr29- Sr58- Pm39*) este o genă cu localizare pe cromozomul 1BL și conferă rezistență la planta adultă. *Lr46* este înlănțuită cu genele *Yr29*, *Sr58* și *Pm39*, ce conferă rezistență la rugina galbenă, rugina neagră și făinare.

Amplificarea ADN s-a realizat cu markerul CAPS csLV46, produsul PCR obținut fiind mai departe clivat cu enzima de restricție *TaqI*. Separarea produșilor PCR s-a realizat pe gel de agaroză "routine use" de 2,5%.

Rezultatele moleculare au evidențiat prezența alelei de rezistență a genei *Lr46* în 10 linii din cele 98 analizate. Aceste 10 linii moștenesc varianta alelică de rezistență pentru gena *Lr46* de la părintele B2-24 (linie de ameliorare).

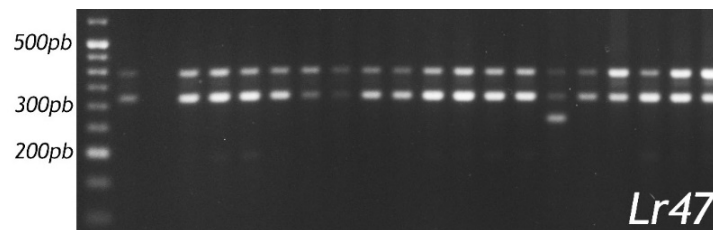


Profilul electroforetic obținut cu markerul csLV46 și clivare cu *TaqI*

Rezultate moleculare - rugina brună

Gena *Lr47* a fost transferată din *Aegilops speltoides*, cromozom 7S pe cromozomul 7A și conferă rezistență la toate stadiile de dezvoltare a plantei. Amplificarea ADN s-a realizat cu primerii PCAPSR, PS10L și PS10L2 (annealing 61°C) utilizând kitul DreamTaq Green PCR Master Mix 2x, într-un volum final de reacție de 15μl (1x master mix, 0.2mM-0.6mM-0.1mM primeri, 70-90ng ADN). Conform literaturii de specialitate pentru alela de rezistență se obține un produs PCR de aproximativ 224pb iar pentru alela de sensibilitate 394pb.

În cazul analizelor moleculare efectuate pe cele 98 de linii s-au obținut produși PCR de dimensiuni diferite de cele menționate în literatura de specialitate. Aceste rezultate sugerează faptul că gena *Lr47* nu este prezentă în materialul biologic analizat sau există o diferență de secvență la acest locus, cu posibilă origine din *Thinopyrum*. Prin urmare, reacția de evidențiere a haplotipurilor pentru această genă va fi repetată/optimizată ulterior.



Profilele electroforetice obținute cu markerul pentru evidențierea haplotipurilor genei *Lr47*

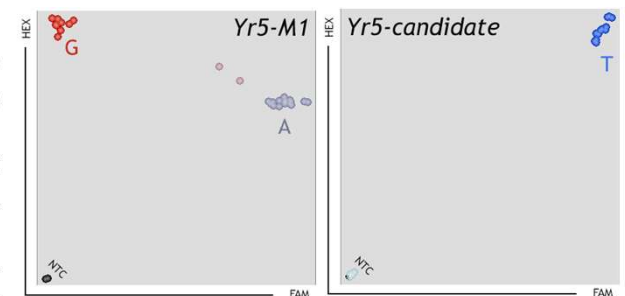
Rezultate moleculare - rugina galbenă

Numeroase gene și QTL-uri au fost identificate pentru toleranța/rezistența la rugina galbenă, boală produsă de patogenul *P. striiformis f. sp. tritici*. În această fază materialul biologic a fost evaluat molecular cu markeri pentru genele *Yr5*, *Yr10*, *Yr15*, *Yr50*, *Yr57*, *Yr78* și *Yr86*. De asemenea, materialul biologic a fost analizat și la nivelul unor QTL-uri selectate din literatura de specialitate.

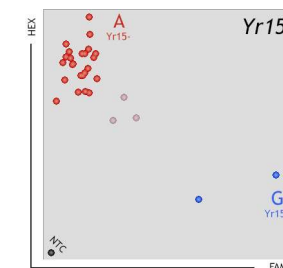
Genă *Yr5* este localizată pe cromozomul 2B și conferă o rezistență la planta adultă de tip HTAP (High Temperature Adult Plant resistance) la anumite rase de patogeni. Din literatura de specialitate au fost selectați doi markeri KASP cu care a fost analizat materialul biologic, respectiv markerul *Yr5-M1* (SNP A favorabil) și *Yr5-candidate* (SNP T favorabil). Testele inițiale efectuate cu acești markeri nu au condus la obținerea unor rezultate satisfăcătoare. Amplificarea cu markerul *Yr5-candidate* a rezultat în obținerea unui singur cluster, respectiv varianta alelică T.

Ulterior a fost identificat în literatura de specialitate un alt marker KASP ce se utilizează la evidențierea variantelor alelice ale genei *Yr5*. Prin urmare, analizele moleculare de la nivelul acestui locus vor fi repetate în fazele următoare ale proiectului.

Genă *Yr15*, cu originea în *Triticum dicoccoides*, este o genă localizată pe cromozomul 1BS ce conferă rezistență în toate etapele de creștere a plantelor. Evidențierea haplotipurilor, SNP G (*Yr15+*) și SNP A (*Yr15-*) s-a realizat prin tehnica KASP cu markerul *Yr15-R8*. Analizele efectuate pe materialul biologic format din cele 98 linii derivate din grâu x *Thinopyrum* nu au evidențiat prezența variantei alelice favorabile de la nivelul locusului *Yr15*. Cu toate acestea, analizele au evidențiat prezența alelei favorabile în 3 amfiploizi sintetici.



Clusterelor obținute în urma citirii rezultatelor pentru evidențierea variantelor alelice ale genei *Yr5*



Evidențierea haplotipurilor genei *Yr15* cu markerul KASP *Yr15-R8*

Rezultate moleculare - rugina galbenă

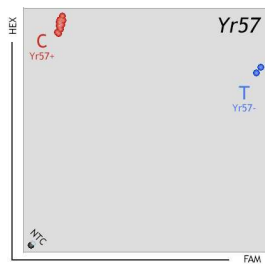
Gena Yr57 localizată pe cromozomul 3BS conferă rezistență în toate etapele de creștere a plantelor (ASR). Evidențierea variantelor alelice (SNP C = Yr57+ și SNP T = Yr57-) s-a realizat cu markerul KASP BS00062676. Analizele efectuate pe materialul biologic format din cele 98 linii derivate din grâu x *Thinopyrum* au evidențiat prezența variantei alelice favorabile (SNP C) în toate liniile.

Gena Yr78 este localizată pe cromozomul 6BS și conferă rezistență la planta adultă. Analizele moleculare s-au realizat cu markerul KASP IWA7257. Rezultatele obținute au evidențiat prezența variantei alelice Yr78+ (SNP T) în 73 din cele 98 de linii analizate (74,5%).

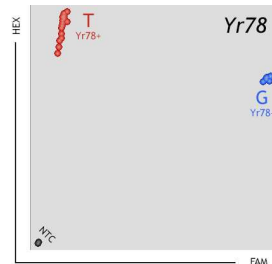
Gena Yr86 a fost caracterizată și validată de Zhu și colab. (2023) pe material biologic obținut din încrucișarea soiurilor chinezești Yangmai 16 cu Zhongmai 895. Gena a fost localizată pe cromozomul 2AL în soiul chinezesc Zhongmai 895, soi ce a prezentat o rezistență stabilă la rugina galbenă la planta adultă. Din cei 20 de markeri identificați în studiul lui Zhu și colab. (2023), au fost evidențiați trei markeri asociați semnificativ cu rezistența la rugina galbenă, respectiv, AX-111479506 (SNP C/T), AX-94907351 (SNP G/A) și K_7127 (A/G).

Analizele efectuate pe materialul biologic din această fază cu markerul AX-111479506 au evidențiat prezența alelei C în 95 de linii și alela T în 3 linii. În cazul markerului AX-94907351 toate cele 98 de linii au prezentat varianta alelică G. Cu toate acestea a fost observată prezența alelei A în unii amfiploizi sintetici.

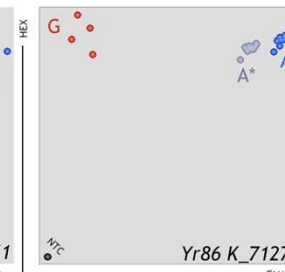
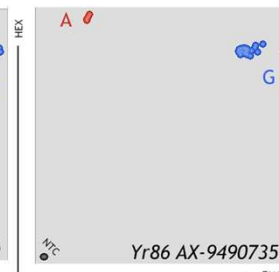
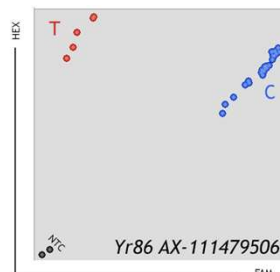
Amplificarea cu markerul K_7127 a condus la obținerea unui cluster suplimentar, observat la nivelul a 15 linii din cele 98 (notat cu A*), în proximitatea clusterului cu varianta alelică A (83 linii). Varianta alelică G a fost observată doar în cazul a 3 amfiploizi sintetici.



Evidențierea haplotipurilor genei Yr57 cu markerul KASP BS00062676



Evidențierea haplotipurilor genei Yr78 cu markerul KASP IWA7257

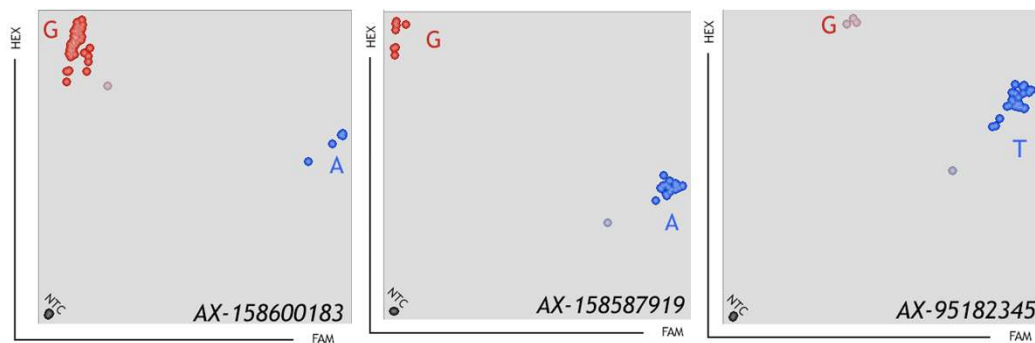


Rezultatele obținute cu markerii KASP AX-111479506, AX-94907351 și K_7127

Rezultate moleculare - rugina galbenă

QYr.nmbu.6A este un QTL important pentru rezistența la rugina galbenă la planta adultă. Lin și colab. (2023) au confirmat efectul acestui QTL în câmpuri experimentale din Europa, China, Kenya și Mexic. Evidențierea haplotipurilor s-a realizat cu ajutorul a 3 markeri KASP, AX-158600183 (A/G), AX-158587919 (A/G) și AX-95182345 (T/G). Conform studiului realizat de Lin și colab. (2023), genotipurile care au prezentat combinația G_G_G au fost cele mai rezistente, pe când cele cu A_A_T au fost cele mai sensibile.

Analizele moleculare efectuate pe materialul format din cele 98 de linii au evidențiat faptul ca la nivelul acestui QTL nici una din linii nu prezintă combinația favorabilă G_G_G. Rezultatele obținute cu markerul AX-158600183 au evidențiat prezența alelei favorabile G în 88 din cele 98 de linii analizate. În cazul markerului AX-158587919, doar 11 linii au prezentat alela favorabilă G, iar pentru markerul AX-95182345 nici una dintre linii nu au alela favorabilă G. Combinația predominantă în materialul analizat a fost G_A_T (combinație de tip mediu-sensibil conform literaturii de specialitate).



Rezultatele obținute cu markerii KASP AX-158600183, AX-158587919 și AX-95182345

Rezultate moleculare - rugina galbenă

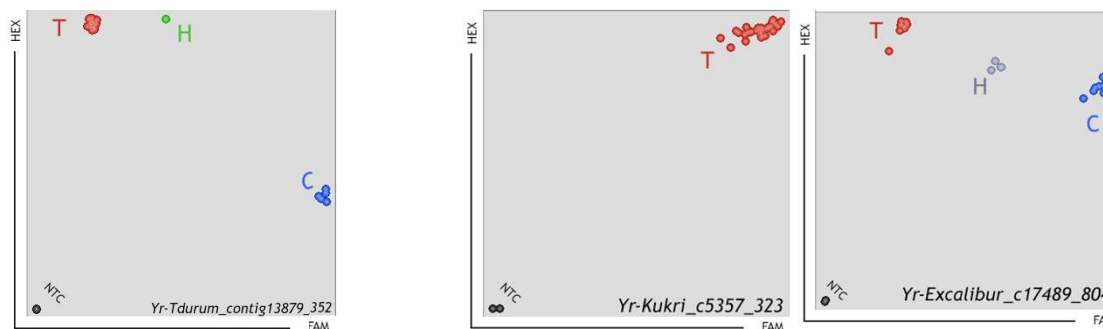
QTL-uri asociate cu rezistența/toleranța la rasele de patogen Warrior (FS 53/20 și G 23/19)

În studiul lui Shahinnia și colab. (2023) au fost identificate 5 SNP-uri asociate cu rezistența/toleranța la rugina galbenă, respectiv rasa Warrior (-) FS 53/20, pe cromozomii 1B, 2A, 5B și 7A, iar în cazul rasei Warrior (-) G 23/19, un singur SNP localizat pe cromozomul 5B. De asemenea, Shahinnia și colab. (2023) au identificat un nou QTL asociat cu markerul Kukri_c5357_323. Varianta alelică G de la acest marker împreună cu varianta alelică T de la markerul Excalibur_c17489_804 au avut cel mai mare efect asupra severității atacului cu rasele Warrior (-) FS 53/20 și Warrior (-) G 23/19.

Analizele moleculare pe materialul format din cele 98 de linii au fost efectuate cu următorii markeri moleculari de tip KASP (SNP-ul notat cu roșu reprezintă alela favorabilă): Yr-Tdurum_contig13879_352 (C/**T**), Yr-Kukri_c5357_323 (**G**/T), Yr-IWA5352 (A/**G**), Yr-AX-94842780 (**A**/G), Yr-AX-95094183 (**C**/T), Yr-AX-94881991 (**A**/G) și Yr-Excalibur_c17489_804 (C/**T**).

Rezultatele obținute cu markerul Yr-Tdurum_contig13879_352 (C/T) au evidențiat prezența alelei favorabile **T** în 81 din cele 98 de linii analizate.

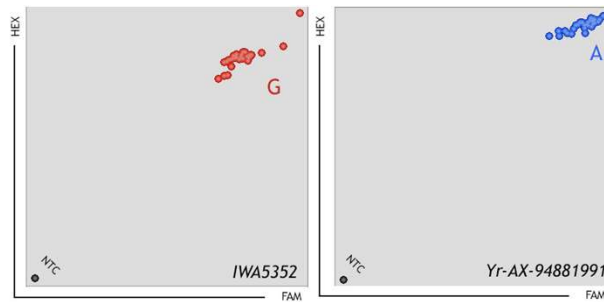
În cazul markerului Yr-Kukri_c5357_323 (G/T) toate probele analizate au prezentat varianta alelică T, în timp ce, pentru markerul Yr-Excalibur_c17489_804 (C/T) 26 din linii au prezentat varianta favorabilă T. Prin urmare, nici una din cele 26 de linii nu prezintă ambele alele favorabile la nivelul acestor doi markeri.



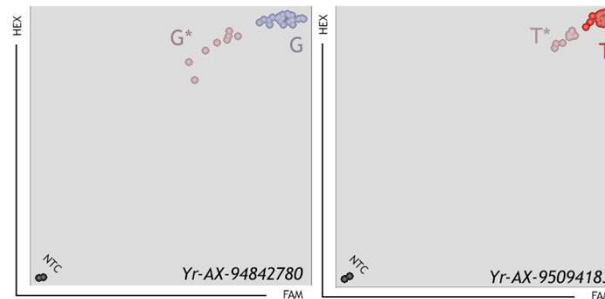
Rezultate moleculare - rugina galbenă

QTL-uri asociate cu rezistența/toleranța la rasele de patogen Warrior (FS 53/20 și G 23/19)

Analizele cu markerii Yr-IWA5352 (A/G) și Yr-AX-94881991 (A/G) au evidențiat faptul că toate probele prezintă variantele alelice favorabile de la nivelul acestor markeri. Prin urmare, toate probele prezintă varianta alelică favorabilă **G** pentru markerul Yr-IWA5352 și varianta alelică favorabilă **A** în cazul markerului Yr-AX-94881991.



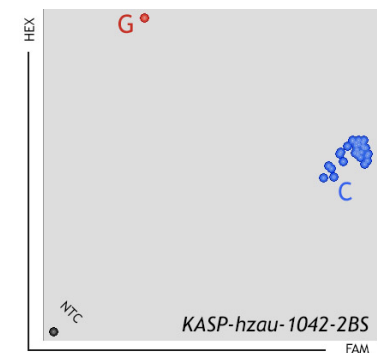
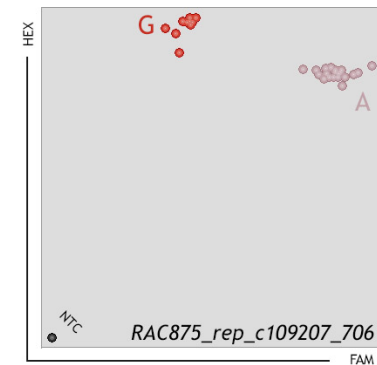
În cazul markerilor Yr-AX-94842780 (A/G) și Yr-AX-95094183 (C/T) variantele alelice prezente în tot materialul biologic analizat sunt nefavorabile, respectiv alela G la nivelul markerului Yr-AX-94842780 și alela C pentru markerul Yr-AX-95094183. Cu toate acestea, a fost observată prezența unui cluster suplimentar (notat cu *) după citirea rezultatelor KASP ceea ce poate semnifica existența unor diferențe de secvență în aceste genotipuri la nivelul acestor markeri.



Rezultate moleculare - rugina galbenă

QTL-ul *QYr.jki-2B.1* este unul din 21 de QTL-uri identificate în studiul lui Rollar și colab. (2021) ce conferă rezistență de tip HTAP. Analizele efectuate pe materialul biologic format din cele 98 de linii cu markerul specific acestui QTL, RAC875_rep_c109207_706, au evidențiat prezența alelei G în 10 linii și alela A în 88 de linii. De asemenea, alela G a fost prezentă și în 4 amfiploizi sintetici.

QYr.hzau-2BS este un QTL minor de rezistență la planta adultă, localizat pe cromozomul 2BS. Analizele efectuate cu markerul KASP-hzau-1042-2BS au arătat faptul că toate liniile analizate în această fază prezintă varianta alelică C. Varianta alelică G a fost prezentă doar în soiul de referință Chinese Spring.



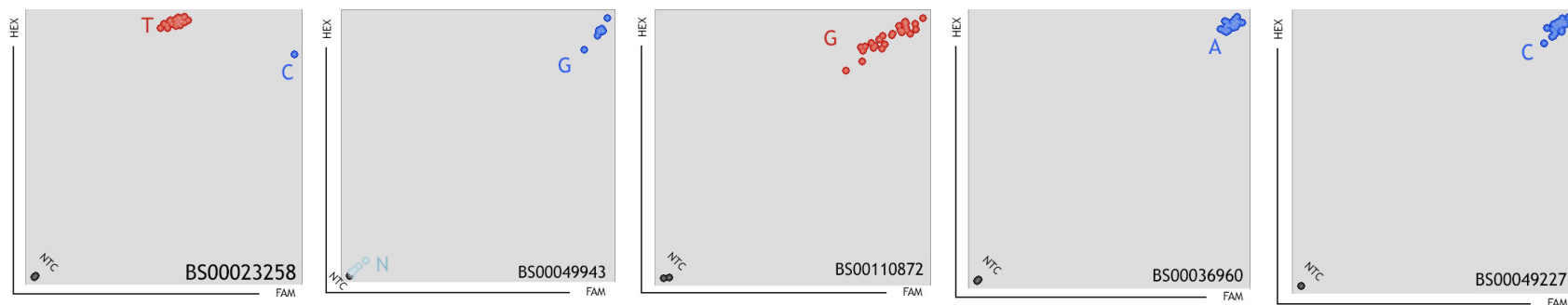
Rezultate moleculare - proteine de rezistență la boli

Plantele rezistă atacurilor patogenilor atât cu apărare preformată, cum ar fi compușii secundari anti-microbieni, cât și prin inducerea unor răspunsuri de apărare. Plantele au dezvoltat sisteme de recunoaștere sofisticate pentru a detecta proteinele produse în timpul infecției cu anumite rase de agenți patogeni. Aceste proteine sunt recunoscute de proteinele de rezistență la bolile plantelor într-un mod foarte specific, descris pentru prima dată genetic ca interacțiunea genă-pentru-genă („gene-for-gene interaction”). Sunt cunoscute cinci clase de proteine de rezistență specifice efectorului, iar secvențele lor sugerează roluri atât în recunoașterea a efectorului, cât și în transducția semnalului (Martin și colab., 2003). În această fază, din baza de date internațională CerealDB, au fost selectați 5 markeri de tip SNP cu posibil rol în rezistența la boli.

Rezultatele obținute cu markerul BS00023258, localizat pe cromozomul 2BL, au evidențiat prezența alelei T în toate cele 98 de linii. Cu toate acestea, alela C a fost observată în amfiploidul E28A.

În cazul markerului BS00049943, localizat pe cromozomul 4AL, analizele au condus la amplificarea ADN doar în cazul liniilor cu varianta alelică G, în timp ce restul liniilor au fost grupate lângă probele de control fără ADN (NTC), sugerând faptul că există o diferență de secvență sau altă variantă alelică în materialul biologic analizat și primerul specific alelei T nu are cum să se prindă în timpul amplificării (rezultat notat cu N).

Amplificarea ADN cu markerii KASP BS00110872 (5AL) A/G, BS00036960 (2DL) A/T și BS00049227 (3DL) C/T a condus la evidențierea prezenței unei singure variante alelice. Prin urmare, toate liniile au prezentat varianta alelică G pentru markerul BS00110872, varianta alelică A pentru markerul BS00036960 și varianta alelică C în cazul markerului BS00049227.



În urma consultării literaturii de specialitate s-au stabilit protocoale de lucru pentru prepararea extractului proteic total, pentru dozarea activității enzimaticе și pentru evidențierea izoformelor următoarelor enzime antioxidante: catalaze, superoxid dismutaze și peroxidaze.

Metodele biochimice propuse pot fi utilizate pentru evidențierea interacțiunii timpurii a plantei cu patogenul *Puccinia* sp. Pentru surprinderea momentului de creștere a activității enzimaticе vor fi necesare infecții controlate.

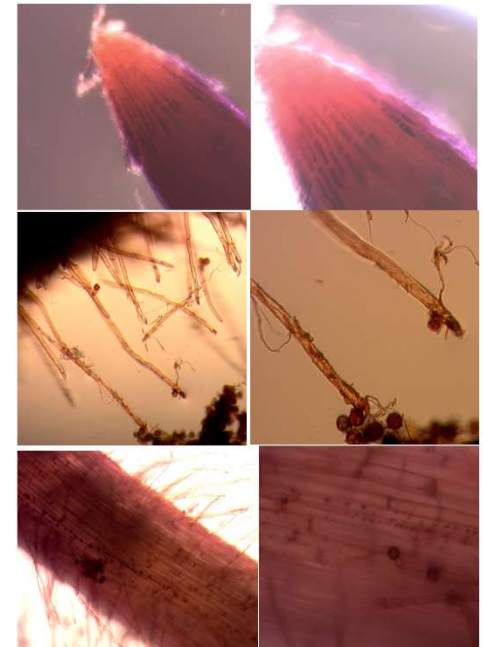
În cazul interacțiunii plantă-*Tilletia* sp., datorită faptului că simptomele bolii se manifestă doar în stadiul de spic, este posibil ca investigarea enzimelor antioxidante să nu ne ofere rezultate concludente în stabilirea prezenței patogenului la nivelul plantei.

Metode de microscopie P2 - IBB

Interacțiunea plantă-*Tilletia* sp. a fost investigată prin metoda dublei colorații cu albastru de anilină și safranină. În urma testărilor realizate s-a observat că evidențierea patogenului folosind această metodă nu este foarte facilă, datorită lipsei contrastului. Pentru optimizarea metodei se vor ajusta timpii de incubare cu fiecare colorant, dar și timpul de spălare pentru îndepărtarea colorantului.

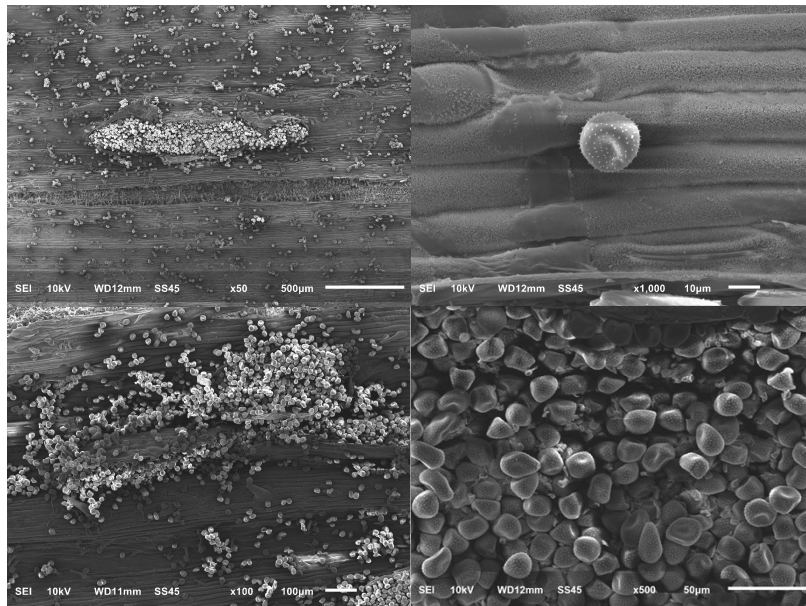
Un alt protocol propus pentru vizualizarea prezenței patogenului la nivelul plantei este cel descris de Ailyffe și colab. (2014).

Aceste metode de colorare și vizualizare pot fi folosite ca și metode complementare pentru evidențierea gradului de infecție al țesutului cu *Puccinia* sp.

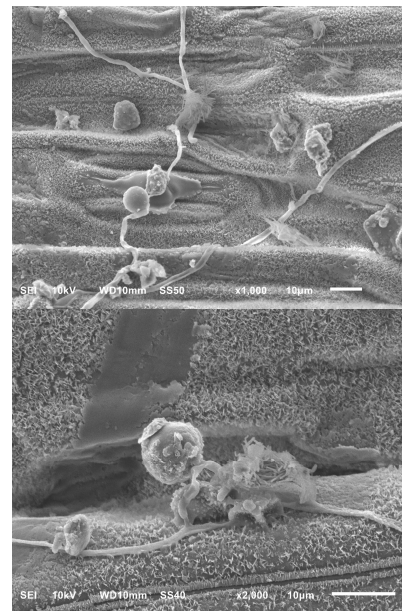


Diferite aspecte ale colonizării rădăcinilor de grâu cu *Tilletia* sp. la probe colorate cu albastru de anilină-safranină

În această fază a fost realizată și testarea metodologiei de pregătire a probelor pentru a fi vizualizate la microscopul electronic cu scanare. Frunzele colectate au fost deshidratate treptat la 4°C, iar fragmente din frunză au fost fixate pe suport și metalizate. În urma testelor realizate, s-a concluzionat că modalitatea de prelucrare a probelor pentru microscopia electronică cu scanare este optimă, permițând vizualizarea urediniilor, a uredinosporilor, a tuburilor de germinare, și a hifelor de *Puccinia* sp. De asemenea, s-a putut vizualiza micromorfologia cristalele de ceară epicuticulară.



Aspect al urediniilor cu uredinospori de *Puccinia* sp. pe suprafața adaxială a frunzei de grâu la genotipul sensibil



Uredinospori germinați de *Puccinia* sp. pe suprafața abaxială a frunzei de grâu la genotipul GGen 32-6



Obturarea ostiolei prin depunerea de ceară pe suprafața abaxială a frunzei de grâu la genotipul GGen 32-6 contaminat cu *Puccinia* sp.

- Analizele moleculare efectuate în această etapă pe set format din 98 de linii derivate din încrucișări grâu x *Thinopyrum* sp. au evidențiat prezența unor elemente genetice favorabile pentru rezistența/toleranța la rugini, respectiv genele *Lr34*, *Lr46*, *Yr57*, *Yr78* cât și alelele favorabile de la nivelul unor QTL-uri pentru rezistență la rugina galbenă;
- Amfiploizii sintetici analizați în această fază a proiectului pot constitui o sursă pentru anumite elemente genetice de rezistență/toleranță la rugini, precum *Lr21*, *Lr22a*, *Lr39* cât și pentru *Yr15*.
- Analizele moleculare efectuate la nivelul SNP-urilor asociate cu rezistența/toleranța la anumite patotipuri ale rasei Warrior au evidențiat 24 de linii ce au cumulat patru elemente/alele favorabile cu localizare pe cromozomii 1B, 1D, 5B și 7A.
- Metodele biochimice și de microscopie din această fază contribuie la evidențierea unei game largi de caracteristici cu importanță în caracterizarea interacțiunii plantă-patogen cât și evidențierea unor mecanisme de evitare a infecțiilor fungice.

- Diversificarea stocului de markerilor moleculari utilizați la evidențierea prezenței elementelor genetice ce conferă rezistență/toleranță la bolile fungice și continuarea analizelor moleculare;
- Aprofundarea analizelor biochimice și de microscopie pe material biologic din următoarea etapă a proiectului;
- Identificarea de linii cu potențial genetic, respectiv, linii în care s-a realizat piramidarea (cumularea) de gene/QTL-uri de rezistență/toleranță la boli fungice;
- Creșterea diversității genetice a materialului biologic prin utilizarea unor specii sălbatice precum *Thinopyrum* sp., *Aegilops* sp., *Triticum dicoccoides*, *T. timopheevii*, *Secale cereale*, etc.