



MINISTERUL AGRICULTURII
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE



ADER 311

Faza II - 2024

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 2/2024

Perioada de derulare: 31.10.2023 - 30.10.2024

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. II/2024 - Dezvoltarea de metode și tehnici pentru studiul rezistenței grâului la bolile criptogamice

Termen: 31.10.2023 - 30.10.2024

Obiectivele fazei:

1. Utilizarea speciilor sălbatice înrudite cu grâul pentru creșterea diversității genetice la nivelul germoplasmei adaptate/ameliorate de grâu de toamnă.
2. Îmbunătățirea metodologiei de testare, validare și selecție a germoplasmei de grâu de toamnă cu însușiri superioare pentru minimizarea impactului bolilor criptogamice.

- Activitate 2.1. Analize moleculare pentru detectarea alelelor de rezistență în vederea piramidării/cumulării genelor ce conferă grâului rezistență la rugini, septorioză și/sau mălură (200 de linii de ameliorare din generații avansate F4 și F5) (CP);
- Activitate 2.2. Analize moleculare pentru detectarea introgresiei genei *Yr15* pentru rezistență la rugină galbenă, în linii de ameliorare (peste 50 linii de grâu) (CP);
- Activitate 2.3. Analize moleculare pentru detectarea unor gene de rezistență la boli criptogamice în specii sălbatice anuale și perene (CP);
- Activitate 2.4. Dezvoltarea populațiilor de introgresie - Hibridări grâu x specii sălbatice (*Thinopyrum*, *Aegilops ventricosa*, *Ae. speltoides*, *Aegilops kotschy*, *Triticum dicoccoides*, *Triticum monoccocum*, *Triticum timopheevii*, *Secale cereale*, etc) (CP);
- Activitate 2.5. Cercetări care vizează obținerea și utilizarea germoplasmei neadaptate, precum descendenții hibridărilor *Triticum durum* x *Aegilops tauschii* și *Triticum timopheevii* x *Aegilops tauschii* (CP);
- Activitate 2.6. Testare fenotipică prin infecții artificiale și/sau naturale, în câmp, a unor specii sălbatice anuale și perene, linii de preameliorare și ameliorare pentru rezistența la principalele boli fungice (CP);
- Activitate 2.7. Elaborarea unor metode de lucru, bazate pe analize genetice, optimizate pentru cuantificarea rapidă a infecției cu rugini, mălură, etc (boli criptogamice) (P1);
- Activitate 2.8. Elaborarea/optimizarea unor metode de microscopie pentru analiza implicării unor componente structurale ale plantelor de grâu în rezistența la ruginile grâului (*Puccinia spp.*) (P2);
- Activitate 2.9. Elaborarea/optimizarea unor metode de microscopie/biochimice pentru evidențierea infecției/rezistenței plantelor de grâu contaminate cu patogeni fungici (P2);
- Activitate 2.10. Studiul cu ajutorul markerilor RGA (disease Resistance Gene Analogs) în vederea identificării unor posibile noi variante alelice de rezistență la boli la speciile sălbatice (P3);
- Activitate 2.11. Realizarea dispozitivului experimental din câmp pentru anul 2025 (CP);
- Activitate 2.12. Introducerea în testare a unor linii cu progres genetic în culturi comparative și multiplicare semințe (CP);
- Activitate 2.13. Diseminare rezultate;
- Activitate 2.14. Analiza rezultatelor preliminare și stabilirea strategiei pentru următoarea etapă (CP, P1, P2, P3).

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.



Rezistența genetică folosită de amelioratori se prezintă sub două clase generale de gene bazate pe efectele lor fenotipice, rezistența specifică rasei sau tulpinii patogenului (genele R) și genele de rezistență a plantelor la faza adultă („adult plant resistance” - APR). Genele R funcționează în principal de la plantulă („seedling resistance” - SR) până la stadiile avansate de creștere a plantelor („all stage resistance” - ASR), în timp ce genele APR funcționează în principal la stadiul de plantă adultă. Genele de rezistență la ruginile grâului din clasele R și APR sunt desemnate *Lr*, *Yr* și *Sr* (pentru rugina brună, galbenă și, respectiv, neagră), fără distincție între clasele R sau APR.

Genele ASR oferă rezistență în toate stadiile de creștere ale plantei dar această rezistență se pierde în timp datorită evoluției continue a patogenului.

Genele APR oferă rezistență durabilă pe termen lung. Unele dintre genele APR, cum ar fi *Lr34*, *Lr46* și *Lr67*, au fost clonate și s-au dovedit a fi loci ce conferă rezistență conferă rezistență durabilă nu numai împotriva ruginii brune, dar și împotriva ruginii galbene, ruginii negre, făinare, și la virusul piticirii galbene a orzului -BYDV: *Lr34/Sr57/Yr18/Pm38/Bdv1*, *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* și *Lr67/Sr55/Yr46/Pm46*

Utilizarea genelor APR împreună cu 4-5 gene de rezistență la plantulă (SR), ASR și/sau QTL-uri este o strategie care oferă rezistență durabilă, putând să ajungă până la imunitate.

Screeningul detaliat al germoplasmei poate duce la descoperirea unor mecanisme alternative de apărare. Mecanismele de evitare pot reduce șansele de infecție. Astfel de exemple de evitare sunt reprezentate de proprietățile suprafeței frunzelor care interferează cu patogenul, orientarea tubului germinativ și găsirea stomatelor pentru a intra în frunze. Stomatele în unele cazuri sunt acoperite excesiv de ceară cuticulară care împiedică tuburile de germinație ale fungilor (*Puccinia* sp.) să recunoască/găsească stomatele, ceea ce duce la eșecul penetrării agentului patogen în frunză.

Translocația cu cromatină de secară

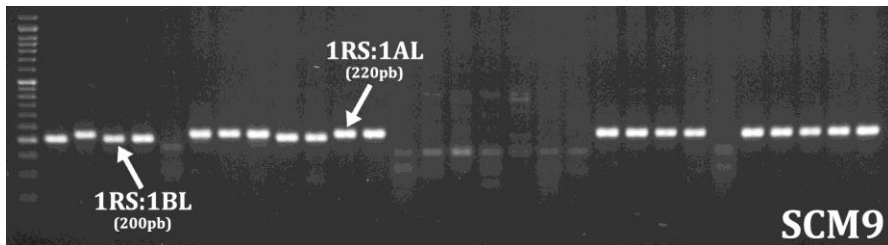
Analizele moleculare au fost demarate cu reacțiile pentru evidențierea prezenței translocației cu cromatină de secară 1RS:1AL în materialul biologic obținut din încrucișările cu părintele B2-98. În cazul materialului biologic obținut din încrucișările cu linia H9G Gri analizele s-au efectuat pentru evidențierea prezenței translocației 1RS:1BL dar și a translocației 1RS:1AL (prezentă în soiul Consecvent). Amplificarea ADN (PCR) s-a realizat cu ajutorul markerului SCM9 (1RS) care indică prezența translocației de secară prin amplificarea unor produși PCR specifici, respectiv, 200pb pentru translocația 1RS:1BL, 220pb pentru 1RS:1AL, absența produsului PCR indicând absența translocației de la secară.

Rezultatele moleculare au evidențiat prezența translocației 1RS:1AL în 49 din cele 58 de linii obținute din încrucișările cu linia B2-98.

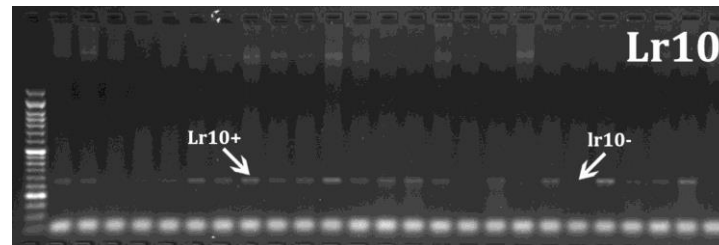
În cazul analizelor pe liniile din încrucișările cu linia H9G Gri rezultatele au evidențiat prezența translocației 1RS:1AL în 69 de linii, 1RS:1BL în 24 de linii și prezența ambelor translocații în 23 linii.

Gena *Lr10* este o genă cu o singură copie pe cromozomul 1AS ce conferă rezistență la rugina brună la nivel de plantulă (SR). Codifică un tip de proteină CC-NBS-LRR cu un domeniu N-terminal, care se află sub selecție diversificată.

Evidențierea haplotipurilor genei *Lr10* s-a realizat cu markerul *Lrk10D* care indică prezența alelei de rezistență prin amplificarea unui fragment de -282pb



Profile electroforetic obținut cu markerul SCM9

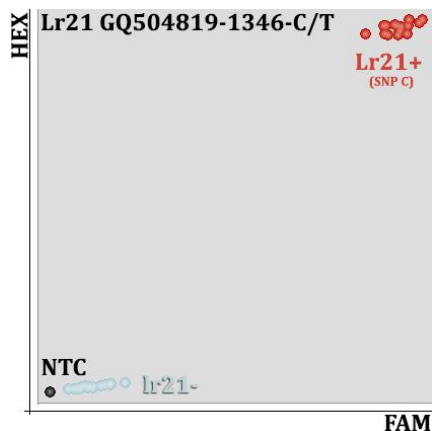


Profile electroforetic obținut cu markerul *Lrk10D* (LR10)

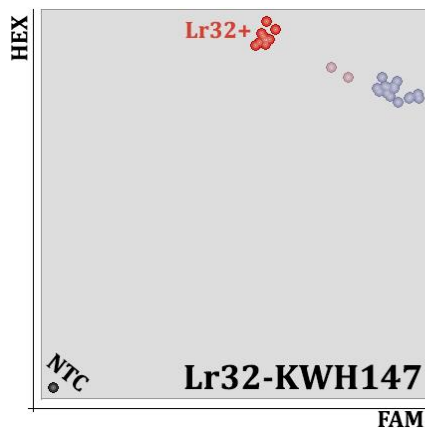
Gena *Lr21* este localizată pe cromozomul 1DS și este o gena ce conferă rezistență la planta adultă (APR). Evidențierea prezenței acestei gene s-a realizat prin tehnica KASP cu markerul de tip SNP (Single Nucleotide Polymorphism) *Lr21* GQ504819-1346-C/T. Varianta alelică ce indică rezistența este SNP C.

Analizele moleculare efectuate pe cele 13 linii din încrucișarea B2-98 x E1A (grupul de linii 411) au evidențiat prezența alelei de rezistență în 10 linii.

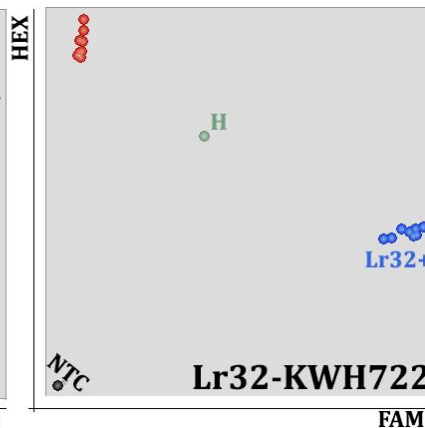
Gena *Lr32* este o genă transferată din *Aegilops tauschii* pe cromozomul 3DS din grâu ce conferă rezistență la rugina brună la planta adultă (APR). Evidențierea haplotipurilor de la nivelul acestei gene s-a realizat cu ajutorul markerilor KASP *Kwh147* și *Kwh722*. Rezultatele moleculare obținute pentru liniile din încrucișarea B2-98 x E1A (grupul de linii 411) au evidențiat prezența alelei de rezistență în două din cele 13 linii.



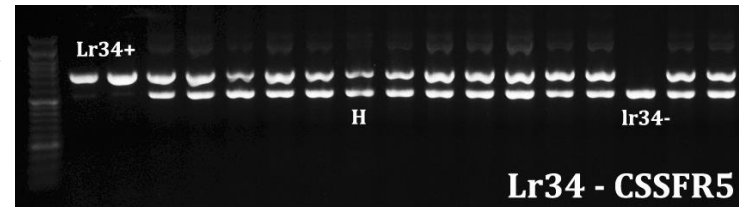
Evidențierea prezenței genei *Lr21* prin tehnica KASP (NTC = No Template Control; C = varianta favorabila)



Evidențierea haplotipurilor genei *Lr32* prin tehnica KASP



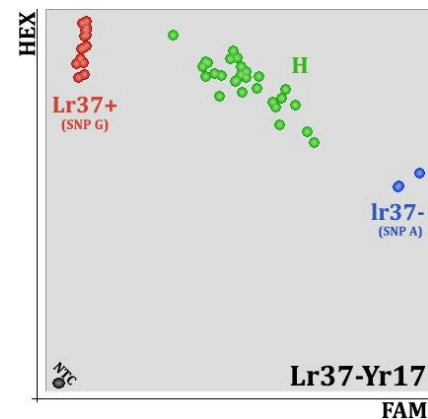
Gena *Lr34*-(*Yr18-Sr57-Pm18*) este localizată pe cromozomul 7DS și conferă rezistență la rugina brună la planta adultă. De asemenea, *Lr34* conferă rezistență și la rugina galbenă (*Yr18*), rugina neagră (*Sr57*) și făinare (*Pm18*). Rezultatele obținute în această etapă cu markerul *cssfr5* au evidențiat prezența alelei de rezistență în stare homozigotă în 20 linii și 115 linii ce prezintă profil heterozigot.



Profil electroforetic obținut cu markerul *cssfr5*

Gena *Lr37* provine de la specia sălbatică *Aegilops ventricosa* (cromozom 2NS) și a fost transferată în grâu (cromozom 2AS) prin încrușări interspecifice. Această translocăție prezintă în afară de gena *Lr37* (rezistență la rugina brună) și genele *Yr17* (rezistență la rugina galbenă) și *Sr38* (rezistență la rugina neagră). Evidențierea haplotipurilor genei *Lr37/Yr17/Sr38* s-a realizat cu ajutorul markerului KASP *Yr17_AL1*.

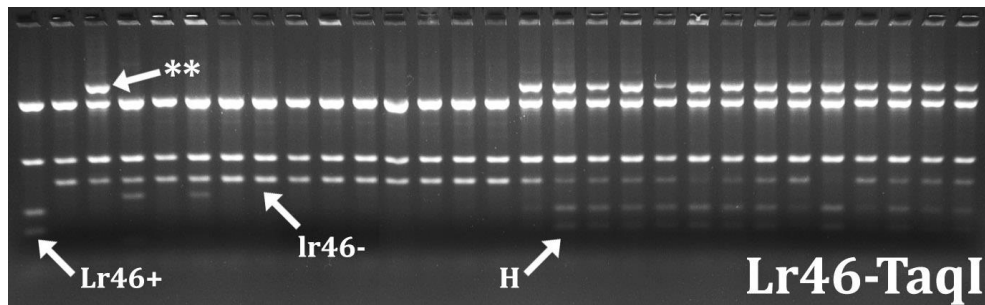
Rezultatele obținute pe grupurile de linii 417 și 419 au evidențiat prezența alelei de rezistență în stare homozigotă în 14 linii, în stare heterozigotă 26 linii și 3 linii cu alela de sensibilitate.



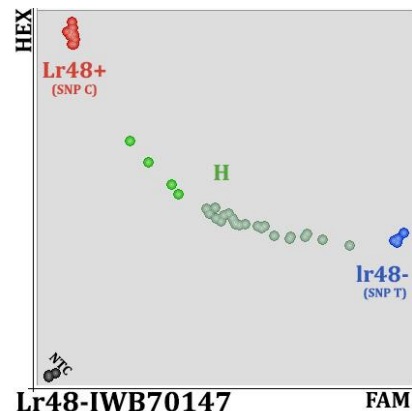
Evidențierea haplotipurilor genei *Lr37* (*Yr17-Sr38*) prin tehnica KASP

Gena *Lr46* (*Yr29- Sr58- Pm39*) este o genă cu localizare pe cromozomul 1BL și conferă rezistență la rugina brună la planta adultă. *Lr46* este înălțuită cu genele *Yr29*, *Sr58* și *Pm39*, ce conferă rezistență la rugina galbenă, rugina neagră și făinare. Analizele efectuate pe grupurile de linii 417 și 419 cu markerul CAPS *csLV46* au arătat prezența alelei de rezistență în stare homozigotă într-o singură linie din grupul 417 (H9g GRI x Bogdana), 13 linii heterozigote și două linii homozigote cu alela de sensibilitate. În cazul grupului de linii 419 (Bogdana x (H9g GRI x Bogdana)), alela de rezistență a fost prezentă în stare homozigotă în 18 linii, 8 linii cu formă heterozigotă și o linie ce prezintă alela de sensibilitate. În cazul liniei de ameliorare H9G Gri s-a observat prezența unui fragment ADN suplimentar de ~900pb (indicat de **). Acest produs a fost observat și în cazul liniilor analizate pentru gena *Lr46*. Aceste rezultate vor fi aprofundate ulterior pentru a stabili dacă acest fragment reprezintă o nouă alelă și/sau dacă prezintă vreun efect asupra rezistenței la rugina brună.

Gena *Lr48* este o genă localizată pe cromozomul 2BS și conferă rezistență la rugina brună la planta adultă (APR). Analizele moleculare s-au realizat pe liniile din grupurile 417 și 419 (Bogdana prezintă alela de rezistență) cu ajutorul markerului KASP *IWB70147*. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că toate liniile din grupul 417 au prezentat forma heterozigotă la nivelul acestui locus. În cazul grupului 419, 15 linii au prezentat alela de rezistență în forma homozigotă, 11 linii formă heterozigotă și o linie cu alela de sensibilitate.



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

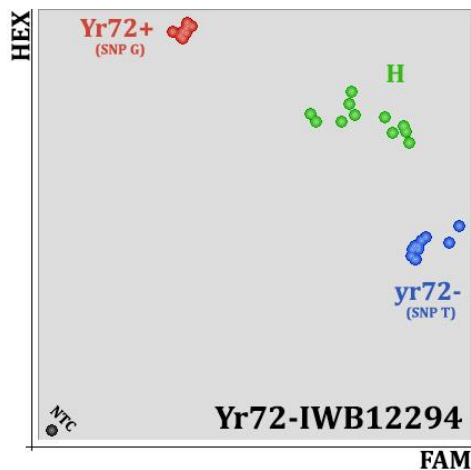


Evidențierea haplotipurilor genei *Lr48* prin tehnica KASP

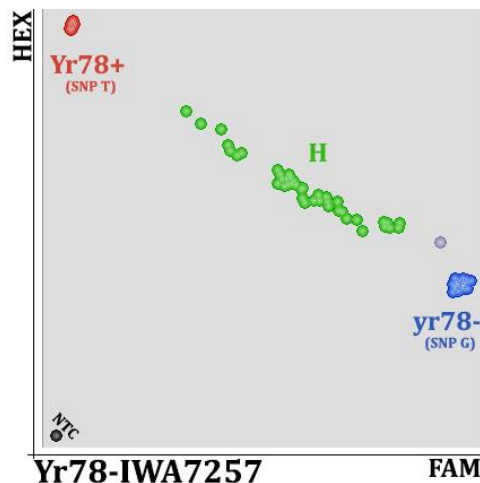
Rezultate moleculare

Gena Yr72 este o genă de rezistență la rugina galbenă localizată pe cromozomul 2BS. Analizele moleculare s-au efectuat cu markerul KASP IWB12294. Analizele au fost efectuate pe liniile care au avut ca forma parentală linia de ameliorare B2-98 deoarece doar această linie prezintă alela de rezistență. Rezultatele moleculare obținute au arătat prezența în formă homozigotă a alelei de rezistență în 12 linii, 34 de linii heterozigote și 12 linii cu alela de sensibilitate.

Gena Yr78 este o genă ce conferă rezistență la rugina galbenă la planta adultă, localizată pe cromozomul 6BS. Analizele moleculare s-au realizat cu markerul KASP IWA7257. Rezultatele obținute pentru cele 197 de linii din această etapă au evidențiat prezența alelei de rezistență în 24 de linii, 110 linii heterozigote și 61 de linii cu alela de sensibilitate



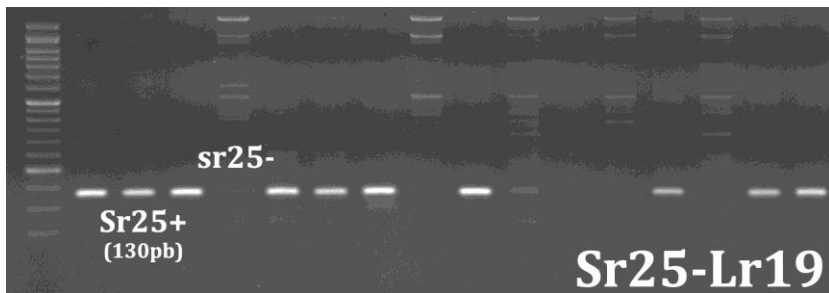
Evidențierea haplotipurilor genei Yr72 prin tehnica KASP



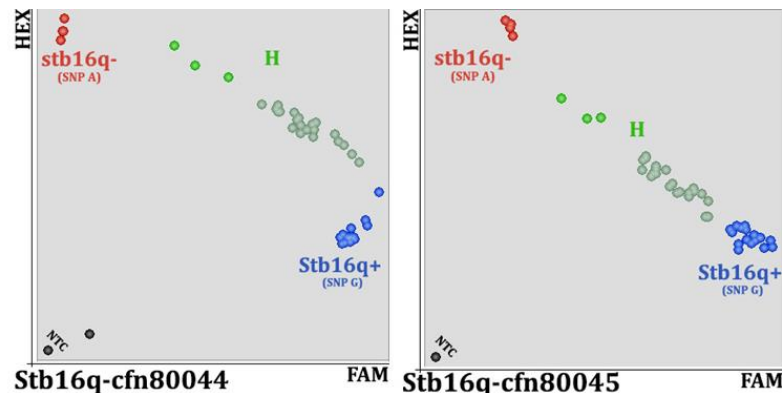
Evidențierea haplotipurilor genei Yr78 prin tehnica KASP

Gena *Sr25* este o genă de rezistență la rugina neagră ce a fost transferată inițial din *Thinopyrum ponticum* Barkworth și Dewey. *Sr25* este înlănțuită cu genele *Lr19* (genă de rezistență la rugina brună) și *PSY-E1* (genă ce influențează sinteza și acumularea de carotenoizi în bobul de grâu) și au fost transferate pe cromozomii 7D și 7A. Analizele efectuate în această etapă s-au efectuat pe liniile provenite din încrucișarea cu amfiploidul sintetic E1A în care a fost identificată prezența genei/genelor *Sr25/Lr19*. Amplificarea ADN s-a realizat cu ajutorul markerului dominant *Sr25-Gb* ce amplifică un produs de ~130pb în liniile în care gena este prezentă. Rezultatele obținute au evidențiat prezența genei în 7 din cele 13 linii analizate.

Gena *Stb16q* din grâu conferă rezistență împotriva unei boli fungice cunoscute sub numele de septorioză, cauzată de agentul patogen *Zymoseptoria tritici*. Evidențierea variantelor alelice ale acestei gene se realizează cu markerii de diagnostic de tip KASP *cfn80044* și *cfn80045*. Rezultatele obținute pe grupul de linii 417 a evidențiat prezența în formă homozigotă a alelei de rezistență (SNP G) în una din cele 16 linii analizate, 13 linii heterozigote și 2 linii cu alela de sensibilitate. În cazul grupului de linii 419, 15 linii au prezentat alela de rezistență (formă homozigotă), 11 linii heterozigote și o linie ce prezintă alela de sensibilitate



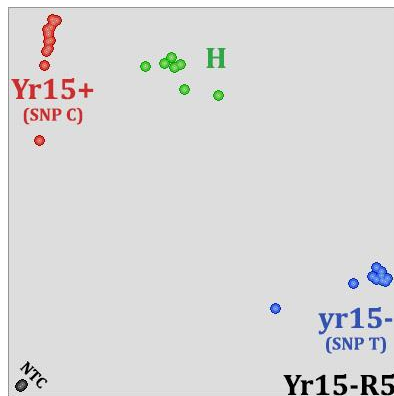
Profilul electroforetic obținut cu markerul *Sr25-Gb*



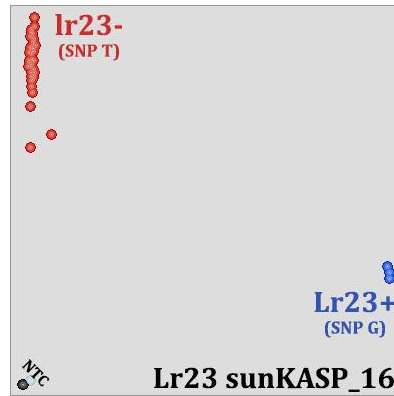
Evidențierea haplotipurilor genei *Stb16q* prin tehnica KASP

Gena *Yr15* (origine *Triticum dicoccoides*) este una dintre principalele gene de rezistență împotriva ruginii galbene (*Puccinia striiformis* f.sp. tritici). *Yr15*, localizată pe cromozomul 1BS, oferă rezistență în toate stadiile de dezvoltare ale plantelor (ASR), rezistență durabilă și de spectru larg, acționând împotriva mai multor rase ale patogenului de rugină galbenă. Analizele din această activitate au fost efectuate cu markerul KASP Yr15-R5 pe material biologic reprezentat de 86 spice recoltate din parcelele programului de ameliorare a grâului privind transferul/introgresia de gene de rezistență la rugina galbenă, respectiv, introgresia genei *Yr15*. Rezultatele moleculare au evidențiat prezența alelei de rezistență în 20 de genotipuri, 7 genotipuri heterozigote și 59 de genotipuri ce prezintă alela de sensibilitate.

Analize moleculare privind genele de rezistență la rugina brună *Lr23*, *Lr32* și *Lr34* realizate pe material biologic format din 29 de amfiploizi sintetici (obținuți din încrucișarea unor soiuri de grâu durum (*Triticum durum*) cu specii de *Aegilops tauschii*) au evidențiat prezența alelei de rezistență în formă homozigotă a genei *Lr23* în 3 amfiploizi sintetici, a genei *Lr32* în 6 amfiploizi sintetici și a genei *Lr34* în 5 amfiploizi sintetici.



Evidențierea haplotipurilor genei *Yr15* prin tehnica KASP



Evidențierea haplotipurilor genei *Lr23* prin tehnica KASP

Obținerea de noi materiale biologice

În această etapă, pentru dezvoltarea populațiilor de introgresie, au fost realizate hibridări grâu x specii sălbatice precum: AGEDUR X *Aegilops columnaris* Zhuk (AE 1187), *Triticum timopheevii* subsp *timopheevii* (IG 147377) X *Aegilops kotschy* Boiss. var. *palaestina* Eig (AE 84), *Triticum turgidum* x *Aegilops kotschy* Boiss. var. *palaestina* Eig (AE 84), etc.

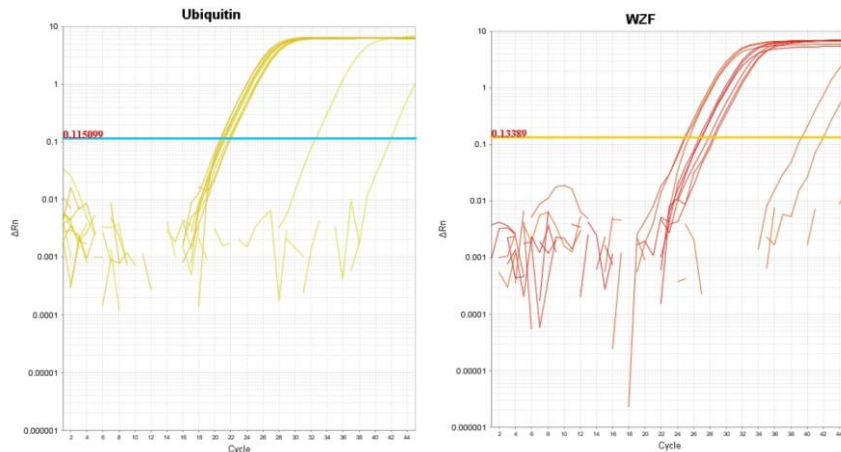
De asemenea, au fost realizate încrucișări între soiuri de grâu și germoplasmă neadaptată, cât și încrucișări între amfiploizi sintetici și germoplasmă neadaptată.



Cuantificarea infecției cu rugini

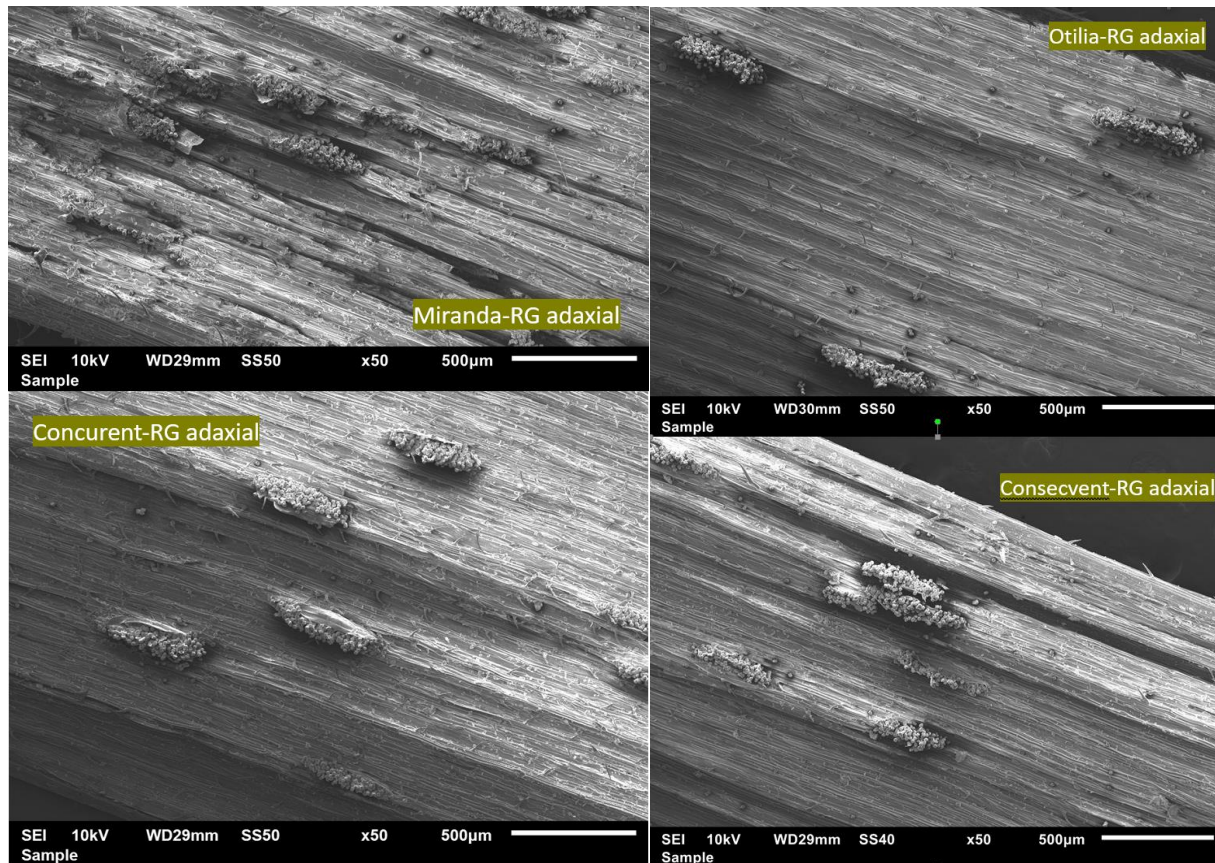
Testarea expresiei genice prin tehnici PCR și RT-PCR a unor regiuni de interes genomic s-a realizat pe material biologic format din linii derivate din grâu x *Thinopyrum*, furnizate de INCDA Fundulea și o parte din materialul aflat în studiu în cadrul câmpurilor experimentale ale USV Iași.

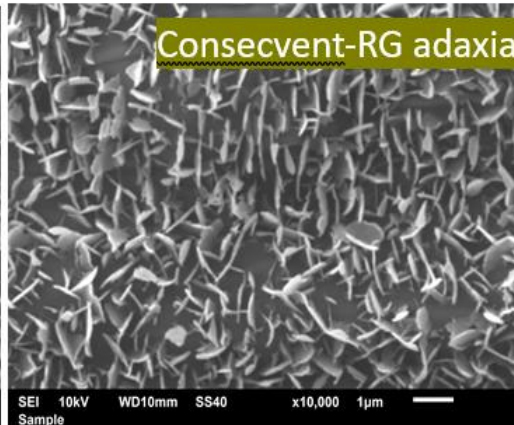
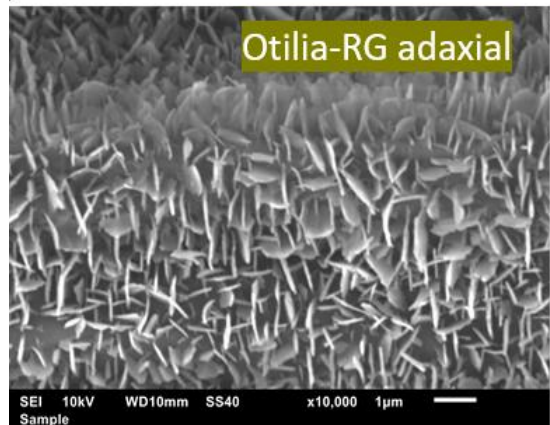
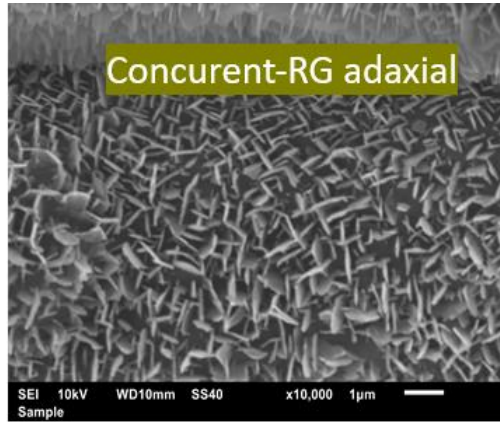
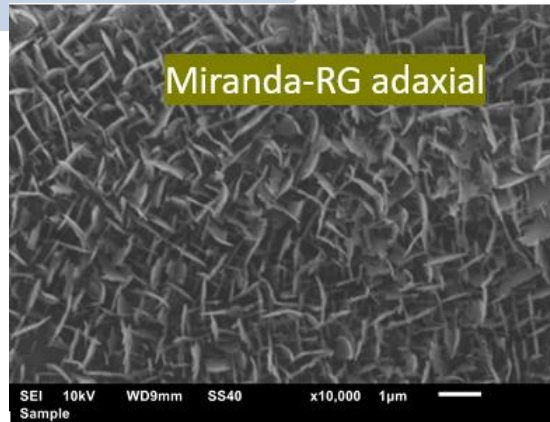
O detectare rapidă și fiabilă detectarea agentului patogen în frunzele de grâu infectate latent este utilă pentru prognozarea precisă și timpurie a focarelor și aplicarea la timp a fungicidelor pentru combaterea bolii. Folosind perechea de primeri Bt2a/Bt2b, s-a obținut un amplicon de 362-bp de la *P. striiformis* f. sp. *tritici* și un amplicon de 486-bp a fost obținut atât de la *P. triticina*. Pe baza rezultatelor, au fost selectate două perechi de primeri pentru cuantificarea absolută în sistemul RT-PCR. O metodă SYBR Green RT-PCR a fost, de asemenea, dezvoltată pentru a detecta *P. striiformis* f. sp. *tritici* în frunzele infectate cu limită de detecție de 15,0 ng ADN din probe de frunze recoltate din câmpurile experimentale. Această metode ar trebui să fie utilă pentru diagnosticarea rapidă și detectarea precisă a *P. striiformis* f. sp. *tritici* în frunzele de grâu infectate pentru combaterea în timp util a bolii.



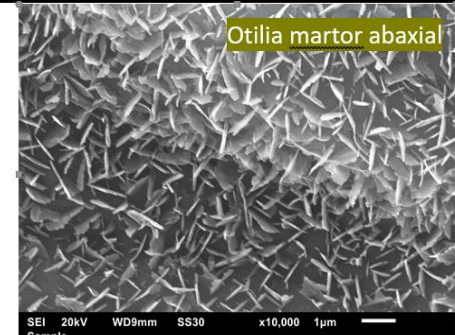
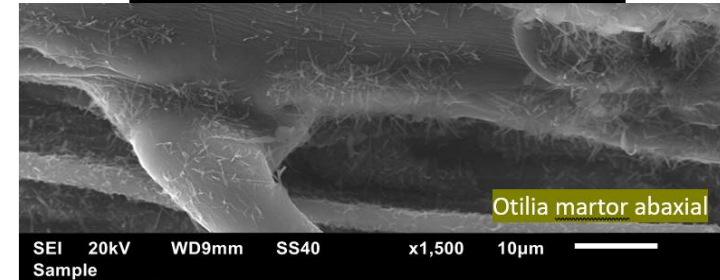
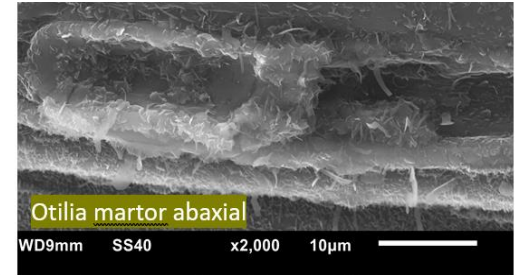
Grafice de amplificare a genelor ubiquitină și WZF

În această etapă au fost analizate suprafețele adaxiale și abaxiale ale frunzelor de grâu necontaminate și contaminate cu rugină galbenă, folosind microscopia electronică cu baleiaj (SEM). S-au urmărit aspecte precum formarea pustulelor, morfologia stratului de ceară epicuticulară și modificări la nivelul stomatelor. Analiza frunzelor la microscopul electronic cu baleiaj a evidențiat colonizarea acestora cu *Puccinia striiformis* la toate soiurile tratate. Au fost observate pustule pe ambele părți ale frunzei, dar acestea predomină pe partea adaxială. Modificările structurii stratului de ceară remarcate la soiurile Otilia și Consecvent indică o reactivitate mai mare a acestor două soiuri în condiții de interacțiune cu patogenul *Puccinia striiformis*, comparativ cu soiurile Miranda și Concurrent. Modificarea modului de cristalizare poate duce la creșterea hidrofobicității suprafeței, ceea ce îngreunează germinarea uredosporilor.



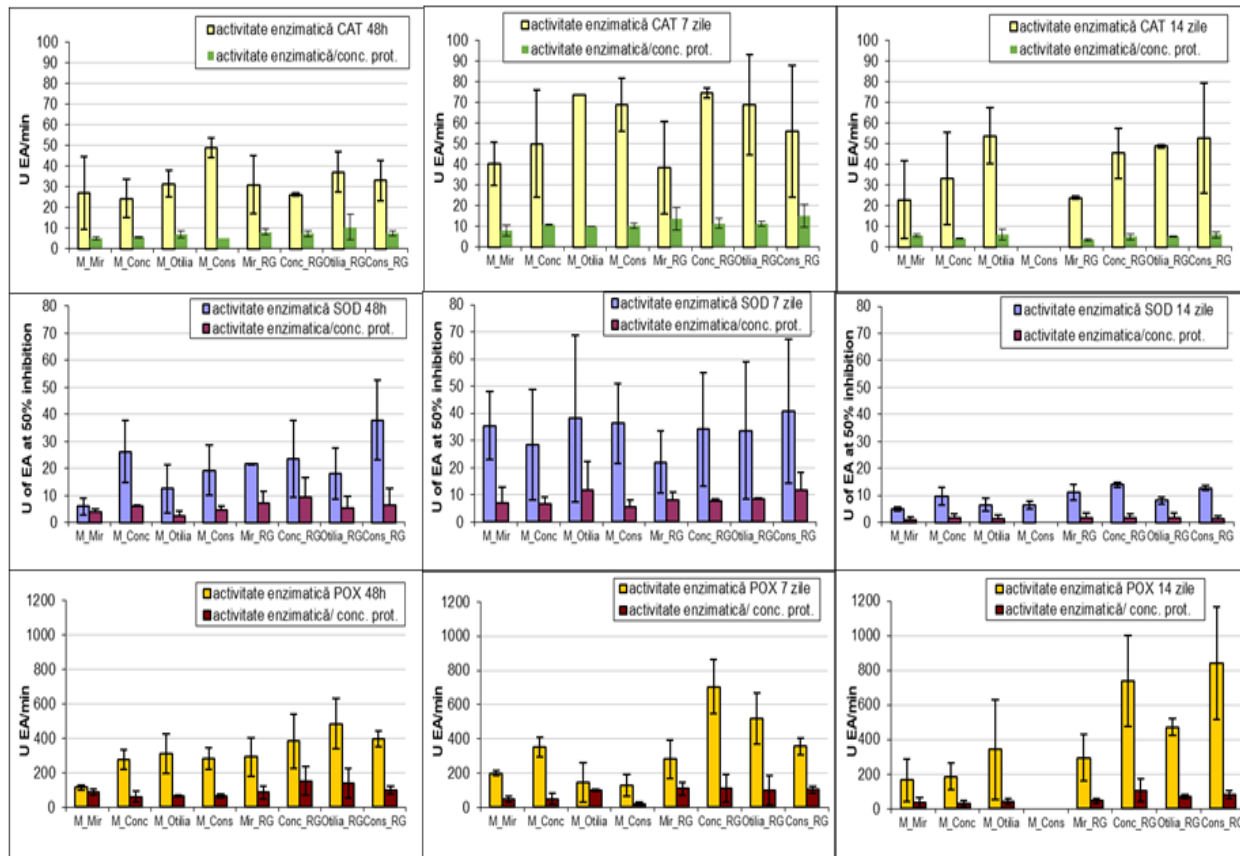


Aspect al cristalelor de ceară pe partea adaxială



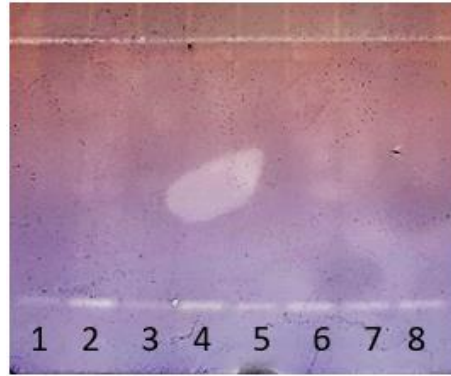
Aspect al cristalelor de ceară pe partea abaxială la varianta mator Otilia

Experimentele de evidențiere a rezistenței plantelor de grâu la rugina galbenă (*Puccinia striiformis*) s-au realizat pe plantule de grâu obținute prin germinare în condiții controlate, plantele au fost tratate cu un amestec de 1:5 spori:puvră de talc. Probele au fost prelevate în trei etape, la 48h, la 7 zile și la 14 zile după contaminarea cu patogen. Analiza spectrelor electroforetice ale SOD și POX a evidențiat izoforme asociate tratamentului cu rugină galbenă la soiurile Consecvent, Otilia și Concurent. Aceasta indică faptul că unul dintre mecanismele de apărare ale acestor soiuri la rugina galbenă este reprezentat de activarea sistemului antioxidant. Aceste rezultate nu arată însă și eficiența acestui mecanism de apărare pentru fiecare soi. Desigur, în reacția de apărare a plantelor pot fi implicate mult mai multe mecanisme, în funcție de genotip putând fi activate diferite căi de apărare, diversitatea acestora asigurând un răspuns eficient la atacul patogenilor.

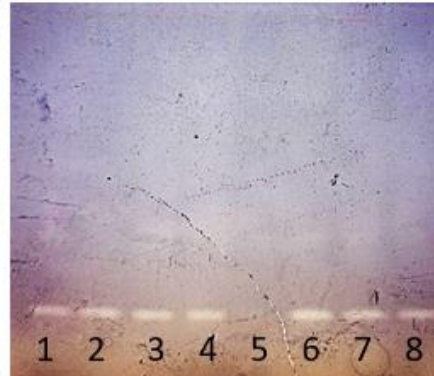


Variante experimentale (SOD 48 h, SOD 7 zile, CAT 48 h, CAT 7 zile, POX 48 h, POX 7 zile, PROT 48 h, PROT 7 zile): 1 martor Miranda, 2 Miranda - rugină galbenă, 3 martor Concurrent, 4 Concurrent - rugină galbenă, 5 martor Otilia, 6 Otilia - rugină galbenă, 7 martor Consecvent, 8 Consecvent - rugină galbenă)

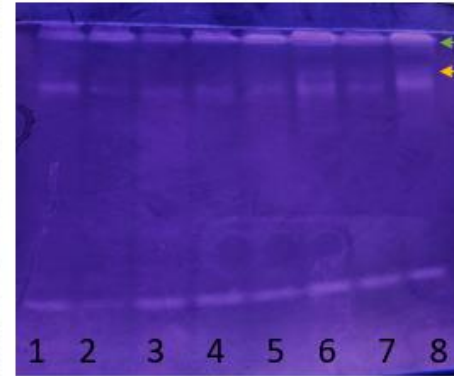
Variante experimentale (SOD 14 zile, CAT 14 zile, POX 14 zile, PROT 14 zile): 1 martor Miranda, 2 martor Concurrent, 3 martor Otilia, 4 martor Consecvent, 5 Miranda - rugină galbenă, 6 Concurrent - rugină galbenă, 7 Otilia - rugină galbenă, 8 Consecvent - rugină galbenă)



SOD 48h



SOD 7 zile



SOD 14 zile

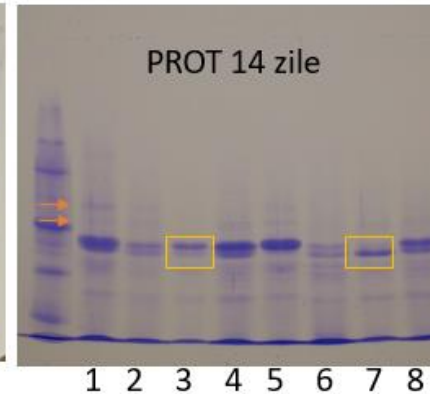
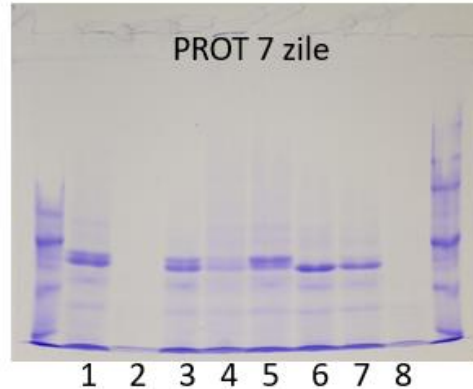
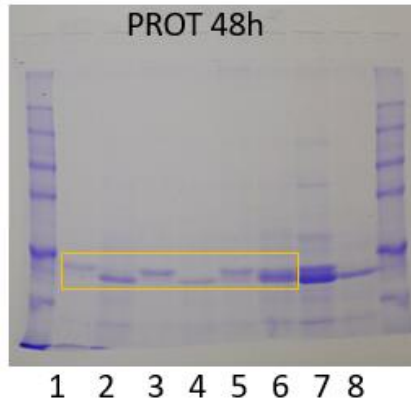
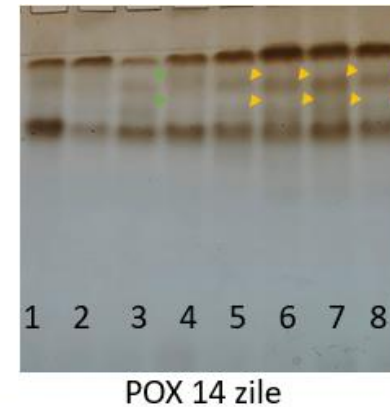
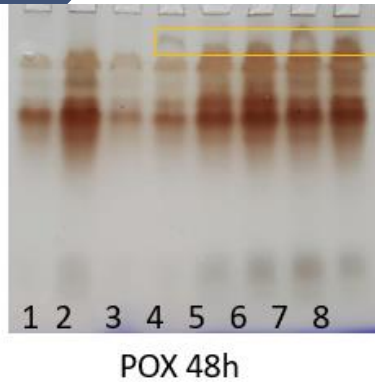


CAT 48h



CAT 14 zile

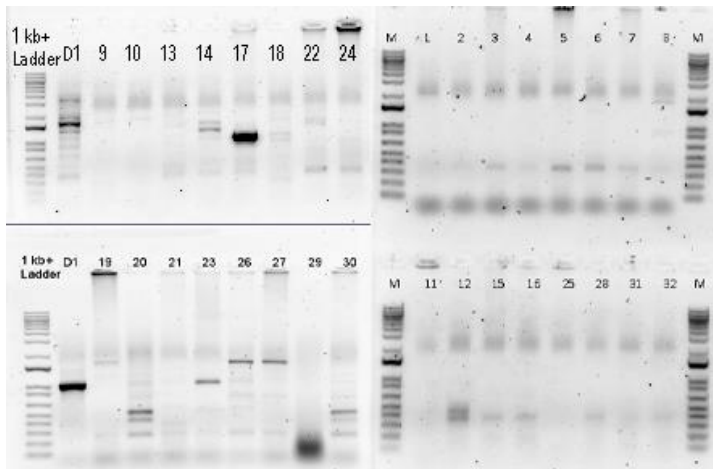
Rezistența la rugini - metode biochimice



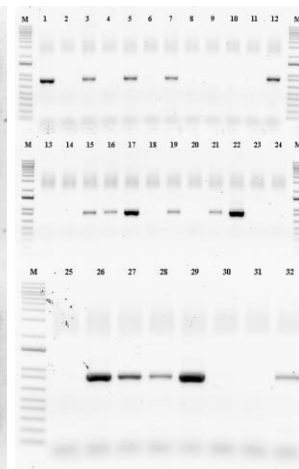
Variante experimentale (SOD 48 h, SOD 7 zile, CAT 48 h, CAT 7 zile, POX 48 h, POX 7 zile, PROT 48 h, PROT 7 zile): 1 martor Miranda, 2 Miranda - rugină galbenă, 3 martor Concurrent, 4 Concurrent - rugină galbenă, 5 martor Otilia, 6 Otilia - rugină galbenă, 7 martor Consecvent, 8 Consecvent - rugină galbenă)

Variante experimentale (SOD 14 zile, CAT 14 zile, POX 14 zile, PROT 14 zile): 1 martor Miranda, 2 martor Concurrent, 3 martor Otilia, 4 martor Consecvent, 5 Miranda - rugină galbenă, 6 Concurrent - rugină galbenă, 7 Otilia - rugină galbenă, 8 Consecvent - rugină galbenă)

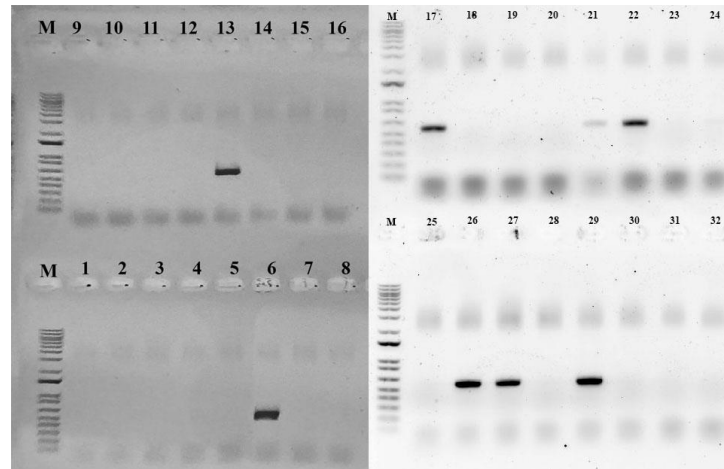
În această etapă au fost aleși pentru analiză 4 markeri pentru gene de rezistență la *Septoria nodorum* blotch (SNB): 1BR_RGA_4B, 1 5B Chi A 2, WAK E 2, și 5B PerOx A1. Materialul biologic analizat a fost format din 32 de probe din specii sălbatice de graminee și o probă din grâu, soiul Dropia. În cazul markerilor 1BR_RGA_4B și 1 5B Chi A 2 s-a reușit amplificarea câte unui singur amplicon la unele specii de graminee. Pentru markerul 1BR_RGA_4B, în urma reacției PCR cu primerii 1BRF NRC 4BF-4BR s-a amplificat câte un singur amplicon pentru probele *Aegilops kotschyii* Boiss. var. *palaestina* Eig (AKO6), *Triticum dicoccoides* (DIC5/24), *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (TIM45), *Triticum timopheevii* (TIM25/24), *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk var. *viticulosum* Zhuk (TIM44), *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (TIM47), *Aegilops speltoides* Tausch subsp. *speltoides* var. *speltoides* (ASP21), *Triticum sphaerococcum* (SPH17), *Triticum timopheevii* (TIM23), *Triticum turgidum* (TRG55), *Triticum dicoccoides* (DIC4), *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (TIM52), *Triticum timopheevii* (TIM20), *Triticum timopheevii* (TIM30), *Triticum turgidum* (TRG54), *Triticum timopheevii* (TIM21) și *Triticum aestivum* L. Dropia. În cazul markerului 1 5B Chi A 2, în urma reacției PCR cu primerii 5B Chi 2AF 2AR s-a amplificat câte un singur amplicon pentru probele *Triticum timopheevii* (TIM39), *Triticum petropavlovskiyi* (ASP21), *Triticum sphaerococcum* (SPH17), *Triticum turgidum* (TRG55), *Triticum dicoccoides* (DIC4), *Triticum timopheevii* subsp. *timopheevii* (TIM52), *Triticum timopheevii* (TIM20) și *Triticum turgidum* (TRG54).



Amplificare cu primeri 1BRF NRC 3BF-3BR



Amplificare cu primerii 1BRF NRC 4BF-4BR



Amplificare cu primerii 5B Chi 2AF 2AR

Realizarea dispozitivului experimental din câmp pentru anul 2025

În această etapă, au fost selectate și semănate linii de perspectivă în câmpul experimental de la INCDA Fundulea. De asemenea, s-au înființat loturi (parcele) pentru înmulțire semințe a 44 de linii de perspectivă.



Aspecte din câmpul experimental INCDA Fundulea 29.10.2024

Analizele moleculare efectuate pe materialul biologic obținut din încrucișările cu liniile de ameliorare B2-98 și H9G Gri au evidențiat prezența unor elemente genetice importante pentru rezistența la boli fungice, transferate de la formele parentale în liniile analizate în această etapă.

În cazul liniilor obținute din încrucișarea Pitar x B2-98 (grup 405), 8 din cele 9 linii analizate au cumulat (în formă homozigotă) translocația de secară $1RS:1AL + Lr34 (Yr18-Sr57-Pm18) + Yr72 + Yr78$.

Analizele moleculare efectuate pe liniile din încrucișarea Otilia x B2-98 (grup 407) cât și liniile din încrucișarea B2-98 x Otilia (grup 410) au condus la evidențierea de linii în care s-a realizat cumularea unor elemente genetice precum:

- 1 linie - $T1RS:1AL + Lr10 + Lr34 + Yr72 + Yr78$ (formă heterozigotă);
- 1 linie - $Lr10+Lr34+Yr72 + Yr78$ (formă heterozigotă);
- 1 linie - $T1RS:1AL+ Lr34 + Yr78 + Yr72$ (formă heterozigotă);

Deoarece liniile se află în segregare, în etapa următoare vor fi obținute noi combinații de gene în formă homozigotă.

Rezultatele moleculare obținute în cazul grupului de linii 411, din încrucișarea liniei B2-98 cu amfiploidul sintetic E1A, au reliefat transferul și cumularea elementelor genetice de la ambele forme parentale. Prin urmare s-au remarcat linii ce prezintă elemente genetice precum:

- 2 linii - $T1RS:1AL + Lr21 + Lr32 + Sr25 + Yr78$ (formă heterozigotă);
- 1 linie - $T1RS:1AL + Lr21 + Lr34 + Sr25 + Yr72$ și $Yr78$ (formă heterozigotă);
- 1 linie - $T1RS:1AL + Lr21 + Lr34 + Yr78$;
- 1 linie - $Lr21 + Yr78 + Sr25$.

În cazul analizelor moleculare efectuate pe liniile obținute din încrucișările H9g Gri x Bogdana (grup 417) s-a observat faptul ca majoritatea liniilor prezintă translocația 1RS:1BL și alela de rezistență a genei *Lr10*. De asemenea, rezultatele au evidențiat faptul că majoritatea liniilor prezintă forme heterozigote la nivelul locilor *Lr34* (*Yr18-Sr57-Pm18*), *Lr37* (*Yr17-Sr38*), *Lr46* (*Yr29-Sr58-Pm39*), *Lr48*, *Yr78* și *Stb16q*, liniile fiind în segregare. Prin urmare, în etapa următoare se vor obține linii ce cumulează în afară de translocația de seară 1RS:1BL și alela de rezistență a genei *Lr10* (formă homozigotă), alele de rezistență de la celelalte gene analizate în această etapă în formă homozigotă.

Rezultatele obținute pentru liniile din grupul 419 (Bogdana x (H9g GRI x Bogdana)) au evidențiat linii în care s-au cumulat elemente genetice de rezistență precum:

- 1 linie - T1RS:1BL+*Lr10*+*Lr37*+*Lr46***+*Lr48*+*Stb16q* + *Lr34* și *Yr78* (formă heterozigotă);
- 3 linii - *Lr10*+*Lr37*+*Lr46***+*Lr48*+*Stb16q* + *Lr34* (formă heterozigotă);
- 1 linie - *Lr10*+*Lr37*+*Lr46*+*Lr48*+*Stb16q*;
- 1 linie - *Lr10*+*Lr34*+*Yr78*.

În cazul grupurilor de linii 418, 421 și 422 (forme parentale H9G Gri și Consecvent) s-au remarcat 23 de linii care prezintă ambele translocații de seară analizate în această etapă, respectiv translocațiile 1RS:1AL (origine părintele Consecvent) și 1RS:1BL (origine H9G Gri), 4 linii ce prezintă doar translocația 1RS:1BL și 69 de linii ce prezintă translocația 1RS:1AL. Dintre acestea, s-au evidențiat linii ce prezintă combinații precum:

- 1 linie cu T1RS:1AL+T1RS:1BL+*Lr10*+*Lr34*;
- 1 linie cu T1RS:1AL+T1RS:1BL+*Lr10*+*Yr78* + *Lr34* (formă heterozigotă);
- 1 linie cu T1RS:1BL+*Lr10*+*Yr78* + *Lr34* (formă heterozigotă);
- 2 linii cu T1RS:1AL+*Lr10*+*Yr78* + *Lr34* (formă heterozigotă).

Rezultatele obținute pe materialul biologic reprezentat de 86 spice recoltate din parcelele programului de ameliorare a grâului privind transferul/introgressia de gene de rezistență la rugina galbenă, respectiv, introgressia genei *Yr15*, au evidențiat prezența alelei de rezistență a acestei gene, în formă homozigotă, la nivelul a 20 de genotipuri.

Analizele efectuate pe materialul biologic format din 29 de amfiploizi sintetici, obținuți din încrucișarea unor soiuri de grâu durum (*Triticum durum*) cu specii de *Aegilops tauschii* au evidențiat prezența alelelor de rezistență ale genelor *Lr23*, *Lr32* și *Lr34*. Amfiploizii sintetici constituie o sursă genetică valoroasă pentru programul de ameliorare la grâu, fapt demonstrat și de rezultatele obținute în cadrul activității 2.1 unde amfiploidul sintetic E1A a fost utilizat ca sursă pentru genele *Lr21*, *Lr32* și *Sr25*.

În această fază s-au reușit încrucișări cu specii sălbatice precum *Aegilops columnaris* Zhuk (AE 1187), *Aegilops tauschii* (PL 231314), *Triticum timopheevii* subsp *timopheevii* (IG 147377), *Aegilops kotschy* Boiss. var. *palaestina* Eig (AE 84), *Aegilops kotschy* (MGD 96063), x *Triticosecale*, etc.

Materialele biologice obținute în cadrul acestei etape sunt valoroase pentru programul de ameliorare de la grâu, evidențiindu-se atât linii cu potențial genetic cât și surse noi de gene (amfiploizi sintetici).

Rezultatele obținute confirmă faptul că obiectivele fazei II/2024 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 anul următor dar și viabilitatea și șansele de succes ale proiectului.

- 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;
- Aprofundarea metodelor de cuantificare rapidă a patogenului prin tehnici RT-PCR;
- Identificarea de noi linii cu potențial genetic, respectiv, linii în care s-a realizat piramidarea (cumularea) de gene/QTL-uri de rezistență/toleranță la boli fungice;
- Înființat loturi (parcele) pentru înmulțire de semințe pentru linii cu progres genetic;
- Creșterea diversității genetice a materialului biologic prin utilizarea unor specii sălbatice precum *Thinopyrum* sp., *Aegilops* sp., *Triticum dicoccoides*, *Triticum timopheevii*, *Secale cereale*, etc.