



PN19.25.01.01 2019-2022

Caracterizarea moleculară a unei germoplasme de grâu privind unele caractere implicate în toleranța grâului la schimbările climatice



PN19.25.01.01(2019-2022)

Proiect finanțat prin: Ministerul Cercetării și Inovării

Tip proiect: PROGRAM NUCLEU - *Perfecționarea bazei genetice și a tehnologiilor de cultură la plantele de câmp pentru creșterea performanțelor și competitivității germoplasmei și a soluțiilor tehnologice identificate în condițiile schimbărilor climatice*

Titlul proiectului: Caracterizarea moleculară a unei germoplasme de grâu privind unele caractere implicate în toleranța grâului la schimbările climatice.

Acronim proiect: PN19.25.01.01

Denumirea obiectivului: Dezvoltarea bazelor genetice și fiziologice pentru crearea de materiale de preameliorare la culturile de câmp și elaborarea de noi indici de selecție

Contract nr.: 26N/26.02.2019

Perioada de derulare: 2019-2022

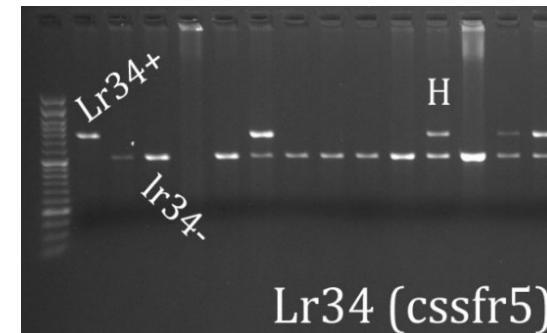
Buget: 754.960lei

OBJECTIVE

1. Studiul variabilității alelice al unor genotipuri de grâu (surse din colecția internațională, material de ameliorare, material cu cromatină de la specii înrudite cu grâul) la nivelul unor importanți loci genetici implicați în arhitectura plantei (*TaPARG*, *Rht*), stresul abiotic (*TaSAP*, *DREB* și *TaSnRK2*), încolțire în spic (*TaMKK3-A*, *TaMFT-A1*, *TaVp1* și *TaSdr*), rezistență la boli (rugini, septorioză, fuzarioză și BYDV). Furnizarea de informații privind prezența alelelor favorabile către programul de ameliorare în scopul accelerării și eficientizării creării de noi soiuri superioare în contextul schimbărilor climatice.
2. Studiul variabilității alelice al unor QTL-uri asociate elementelor implicate în toleranța grâului la secetă și arșiță precum: indicele de vegetație, rata de umplere a bobului, conținutul de carbohidrații solubili, temperatura lanului, osmoreglarea și conținutul de clorofilă.
3. Utilizarea selecției asistate de markeri în transferul de alele/QTL-uri favorabile, folosind o schemă de backcross.

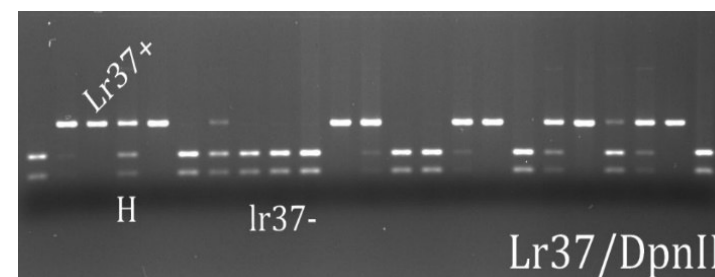
***Lr34/ Yr18 // Sr57 / Ltn1* - cssfr5 multiplex PCR**

- 7% - alela de rezistență *Lr34+*;
- 12% - heterozigote H;
- 82% - alela de sensibilitate *lr34-*.



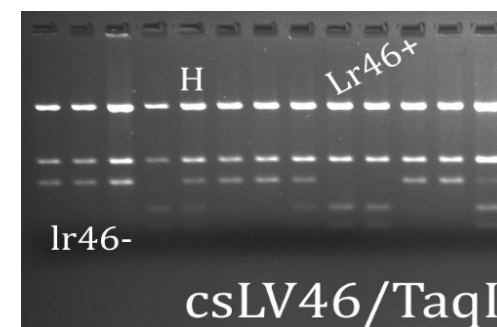
Lr37/Yr17/Sr38* - URIC-LN2 + *DpnII

- 30% -N genom cu *Lr37*, haplotipul rezistent (NN);
- 7% heterozigote (AN);
- 63% - A genom cu haplotipul sensibil (AA).



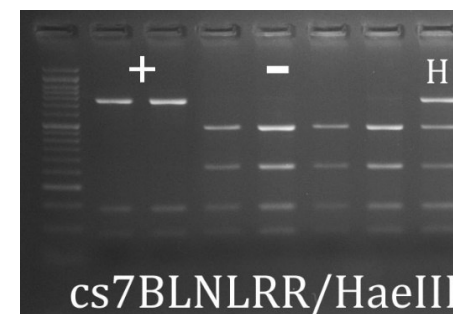
Lr46/ Yr29 // Sr58 / Ltn2* - csLV46 + *TaqI

- 20% -alela de rezistență (*Lr46+*);
- 10% - heterozigote (H);
- 70% - alela de sensibilitate(*lr46-*).



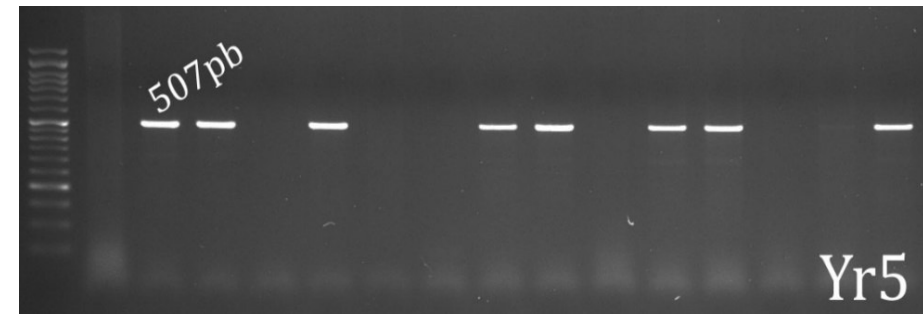
Lr68* - cs7BLNLRR + *HaeIII

- 2% - alela de rezistență *Lr68+*;
- 3% - heterozigote (both alleles);
- 95% - alela de sensibilitate *lr68-*.



REZULTATE

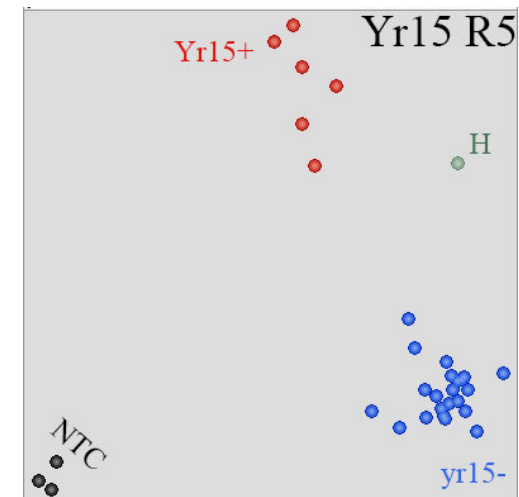
YrSP/Yr5 -(rugina galbenă)- a fost detectată în majoritatea materialelor analizate (68,5%);



Yr15

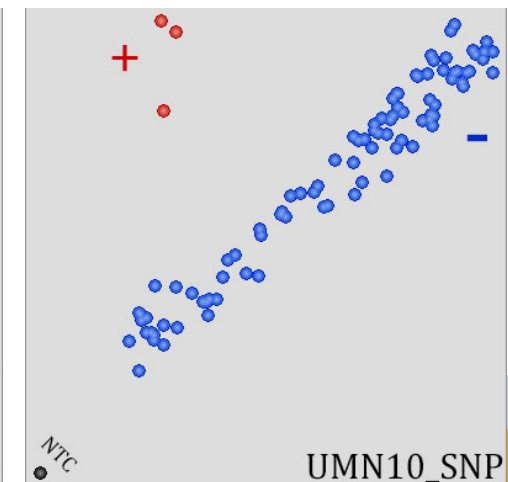
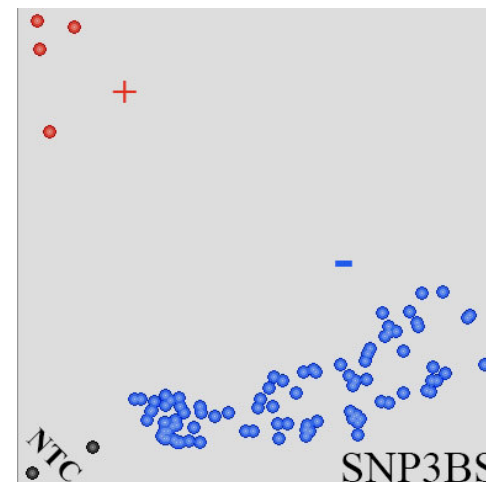
Analizele moleculare efectuate pentru detectarea genei *Yr15* au fost realizate cu doi markeri KASP (*Yr15-R5* și *Yr15-R8*).

Yr15- a fost detectată în genotipurile GDD15-15, 15-16 și GDD15-19.



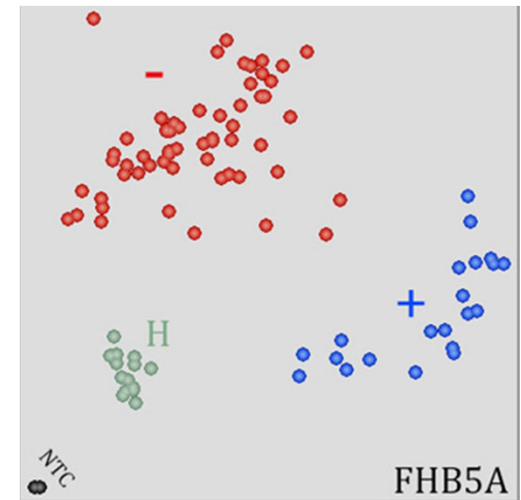
***Fhb1*- rezistență la fuzarioză**

Analizele moleculare pentru gena *Fhb1* au fost efectuate cu doi markeri KASP (*SNP3BS* și *UMN10_SNP*), având ca material de referință soiul Sumai3. Rezultatele au evidențiat prezența acestei gene importante în două linii, GCO 3-5 și GDD 3-22.



REZULTATE

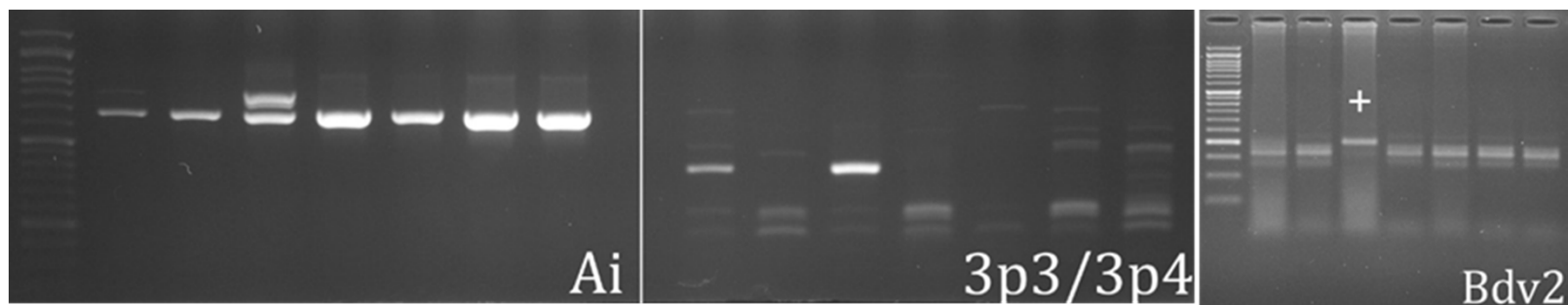
QFhb.hbaas-5AS (toleranță la fuzarioză) -> analiza cu markerul KASP FHB5A_Ex_c95453_1499 a evidențiat prezența acestui QTL într-un număr mare de linii (75%).



Stb16q (rezistență la septorioză)

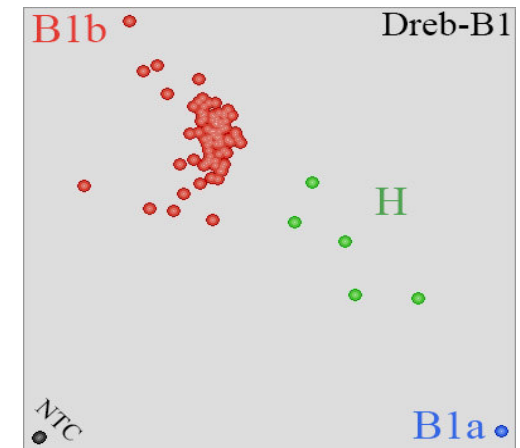
Analizele moleculare efectuate cu markerii KASP cfn80044 și cfn80045 au evidențiat prezența alelei de rezistență în liniile GCO2-5 și GCO2-15 (*Stb16q_a*) în stare homozigotă și încă 5 linii în stare heterozigotă (H). Având în vedere că originea acestei gene este specia sălbatică *Ae. tauschii* (genitorul genomului D de la grâu) am introdus în analiză și 5 amfiplozi sintetici (*T.durum* x *Ae. tauschii*) rezultatele au indicat prezența acestei gene în amfiploidul E16A.

Bdv2 (rezistență la virusul piticirii și îngălbenirii orzului la grâu)- au fost efectuate analize cu patru markeri moleculari: markerul SCAR- SC-gp1 350pb (7Ai I), markerii Ai și 3p3/3P4 asociați cu cromatină de pir și markerul SSR-Bdv2. Rezultatele au confirmat clar prezența genei *Bdv2* în linia GDD2-25.



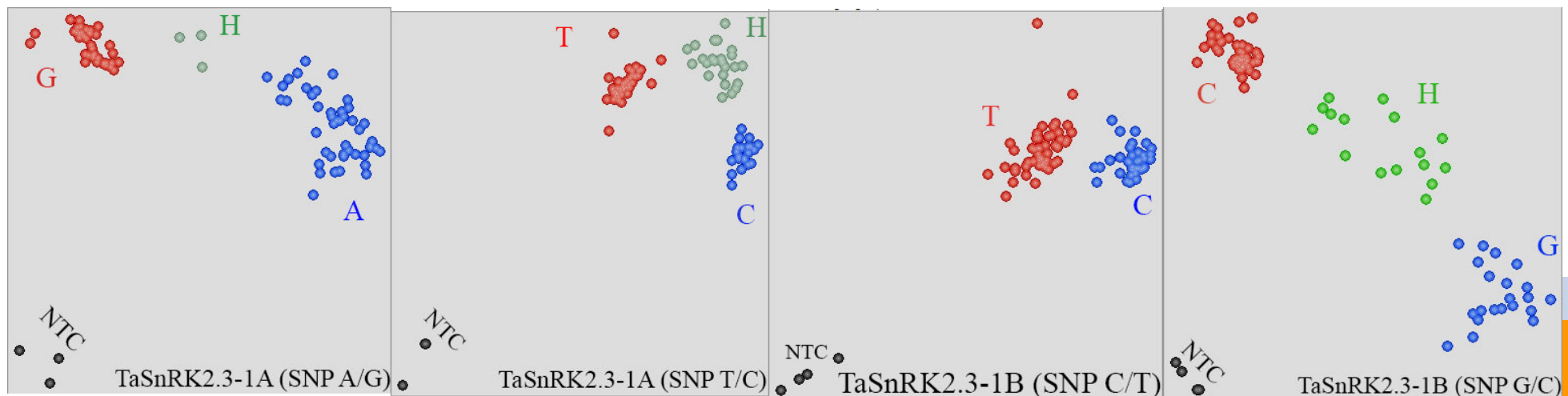
REZULTATE

Dreb-B1 (genă cu rol în toleranță la secetă) » Rezultatele au evidențiat prezența variantei Dreb-B1a doar în linia GCO3-12, varianta ce determină toleranță la factorii de stres abiotic precum seceta, salinitatea și temperaturile scăzute. De asemenea, cinci linii se prezintă sub formă heterozigotă (Dreb-B1a/b).



TaSnRK2.3-1A » markerii KASP au evidențiat prezența a două haplotipuri Hap-1 (CA) și Hap-2 (TG) dar și materiale în stare heterozigotă. Dintre cele două haplotipuri, Hap-1 reprezintă haplotipul favorabil și a fost evidențiat în 21 de linii de ameliorare reprezentând 23% din materialul analizat.

TaSnRK2.3-1B » markerii KASP au evidențiat trei haplotipuri Hap-1 (CG), Hap-2 (TC) și Hap-3 (CC). Haplotipul favorabil Hap-1 a fost evidențiat în 43 de linii, reprezentând 47% din materialul analizat, pe când Hap-3 a fost evidențiat doar la linia GDD14-4.

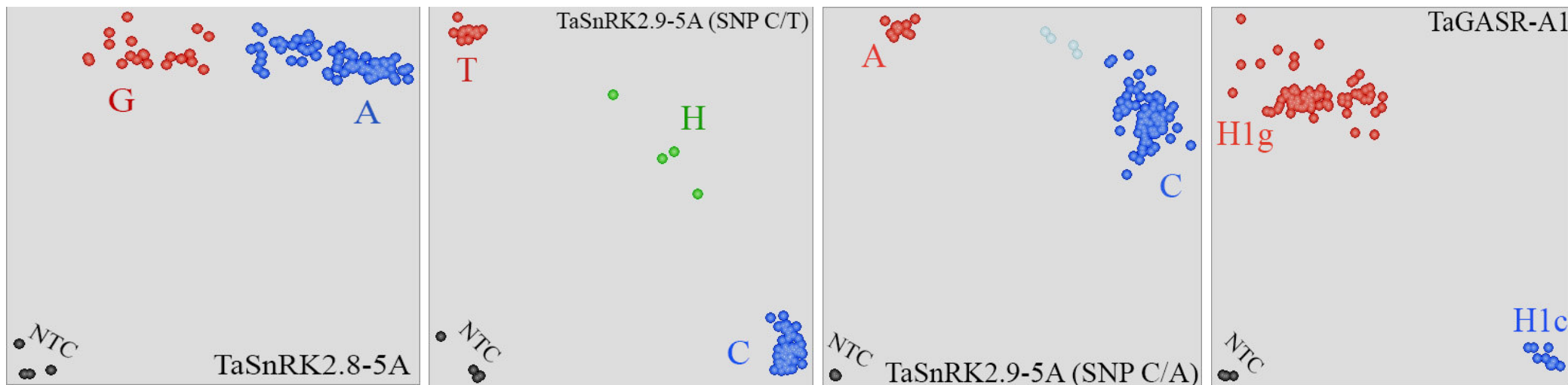


REZULTATE

TaSnRK2.8 » Analiza moleculară KASP a evidențiat prezența haplotipului favorabil, Hap-1 (SNP - A) în peste 78% dintre liniile analizate.

TaSnRK2.9 » markerii KASP au evidențiat trei haplotipuri Hap-1 (TA), Hap-2 (TC) și Hap-3 (CC) iar dintre acestea Hap-3 a fost prezent în majoritatea materialului analizat. Haplotipurile favorabile s-au evidențiat într-un număr redus de materiale, Hap-1 s-a regăsit în 12 linii (13%) iar Hap-2 doar în trei linii. Haplotipul Hap-4 (CA) nu s-a regăsit în materialul analizat.

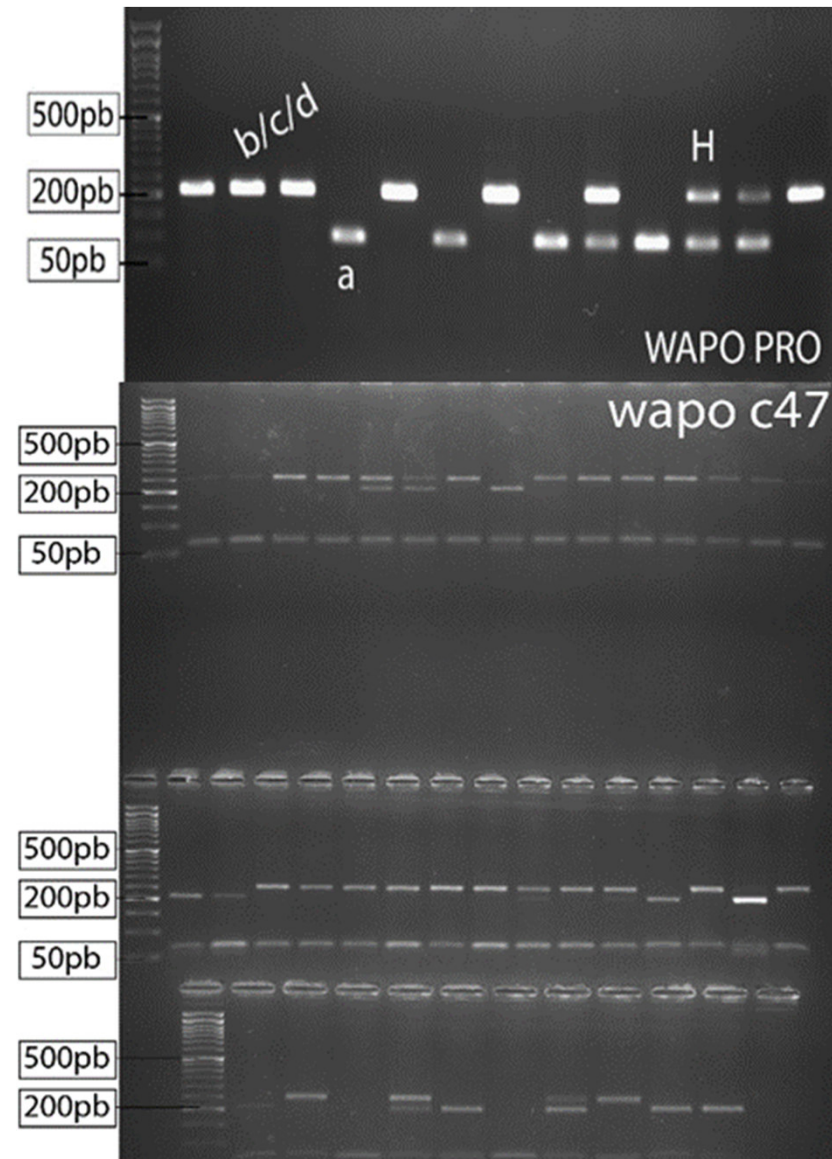
TaGASR7-A1 » prezintă două haplotipuri H1c și H1g. Rezultatele obținute cu markerul KASP a evidențiat prezența haplotipului favorabil, H1c, în 14 linii (15%).



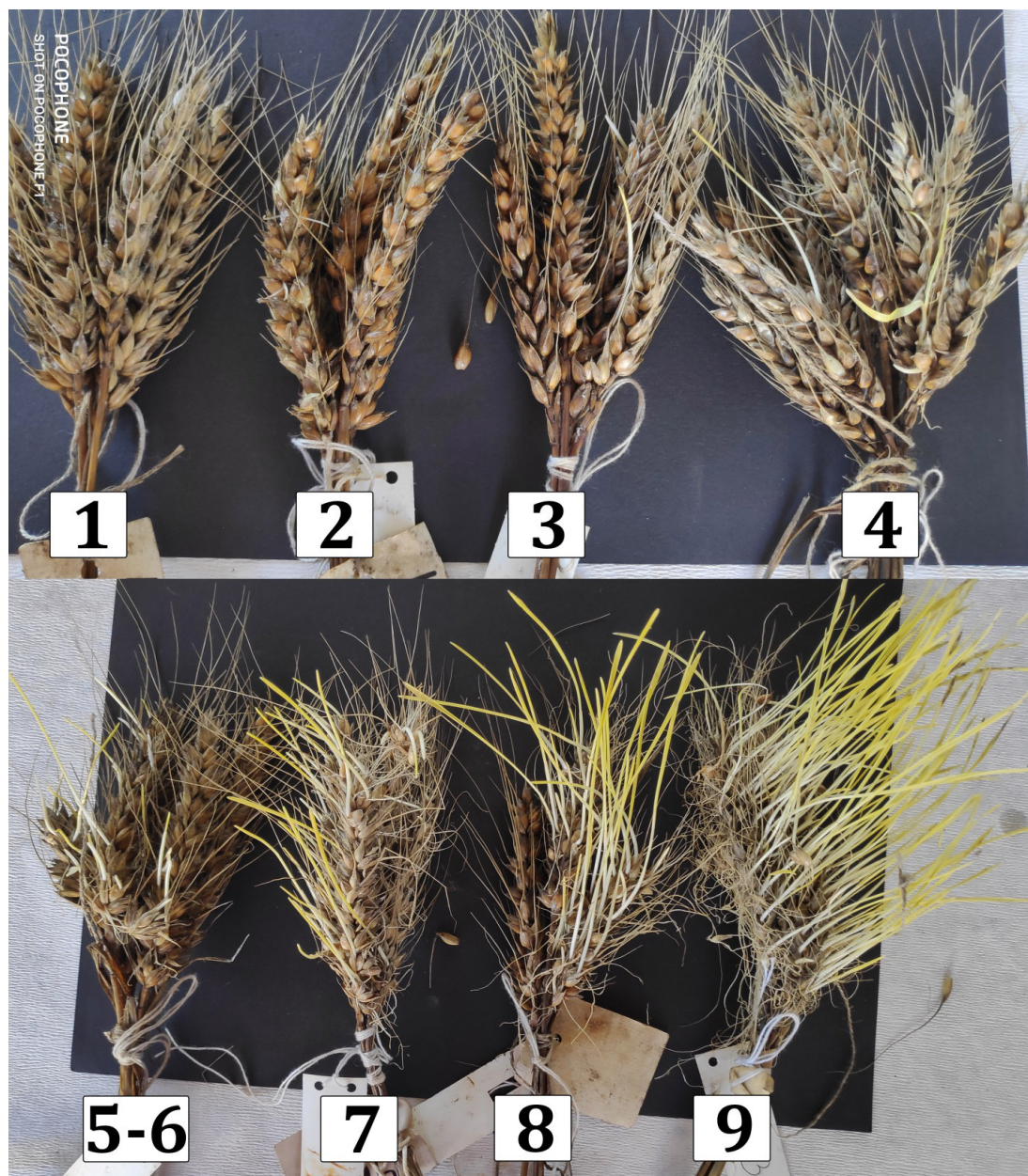
REZULTATE

Gena *TaAPO-A1* sau *WAPO-A1* prezintă trei haplotipuri: H1, H2 și H3. Haplotipul H2 a fost asociat cu valori superioare ale NTSS comparativ cu celelalte două haplotipuri, H1 și H3. Alela *WAPO-A1* prezintă în haplotipul H2 a fost desemnată ***WAPO-A1b*** și cea prezentă în haplotipul H1 drept *WAPO-A1a*. Haplotipul H3 include două alele, *WAPO-A1c* și *WAPO-A1d*. Proteina codificată de *WAPO-A1b* prezintă o modificare în lanțul de aminoacizi, de la nivelul regiunii C47F, care o diferențiază de variantele găsite în celelalte haplotipuri. De asemenea, această alelă se diferențiază și printr-o inserție/deleție (INDEL) de 115pb la nivelul promotorului genei *WAPO-A1* (Kuzay și colab., 2019).

Rezultatele acestui studiu au arătat că 60% din materialul analizat prezintă haplotipul favorabil H2 (alela *WAPO-A1b*) iar în cazul a doi amfiploizi sintetici (E6 și E18) rezultatele au fost diferite de cele din literatura de specialitate, prin urmare analizele pentru amfiploizii sintetici vor fi repetate pentru confirmarea rezultatelor.



Încolțirea în spic reprezintă germinarea prematură a seminței de grâu, astfel încât embrionul începe să crească în timp ce bobul este încă în spic pe câmp. Acest lucru apare atunci când condițiile umede întârzie recolta. Distribuția și severitatea încolțirii boabelor în spic variază de la an la an în funcție de vreme, dar tinde să fie o problemă în România datorită schimbărilor climatice. Dormanța slabă poate reprezenta un avantaj pentru productivitate datorită apariției uniforme și un dezavantaj pentru riscurile creșterii încolțirii boabelor în spic, care scade calitatea și producția boabelor.



Note test artificial pentru aprecierea încolțirii boabelor în spic

- Testele artificiale efectuate în această fază pentru fenotiparea populației de linii RIL rezultate din hibridarea Boema X F000628G-34 au diferențiat materialul biologic analizat în linii rezistente (R), linii sensibile (S), linii moderat rezistente (MR) și linii moderat sensibile (MS) la încolțirea boabelor de grâu în spic.
- Testul artificial pentru aprecierea încolțirii boabelor în spic a demonstrat că linia F000628G-34 este o varietate dormantă pe când soiul de grâu Boema este non-dormant.
- La nivelul locusului *TaMKK3-TaPHS1-4AL*, analizele moleculare din cadrul studiului nostru cu markerul *TaMKK3-A caps/ Hpy166II (MjaIV)* nu au evidențiat polimorfism între cei doi părinți, mai mult s-a arătat că este prezentă alela pentru non - dormantă.
- Polimorfism la nivelul locusului *TaMKK3*, în cadrul studiului nostru, s-a obținut doar cu markerul recomandat de Torada și colab. (2016)- XMKK3.
- Analiza efectuată pentru locusul *PM19-A1*, pe materialul nostru, a demonstrat că la nivelul celor doi părinți nu avem alela asociată cu dormantă.
- La nivelul locusului *Vp-1A* s-a evidențiat polimorfism între formele parentale ale populației pentru studiul încolțirii în spic dar în acest moment nu știm care este varianta alelică favorabilă asociată rezistenței la încolțirea în spic.
- În studiul nostru *Vp1-1B* a fost analizat folosind markerul STS-Vp1B3, care produce fragmente de 845 sau 569 pb în liniile rezistente la încolțirea boabelor în spic și un fragment de 652pb în liniile sensibile. Pe baza rezultatelor noastre putem spune că o varianta alelică favorabilă se evidențiază în linia F000628-G34.

- *TaSdr* a fost punctul central al mai multor studii recente și explică o cantitate moderată de variație fenotipică la încolțirea boabelor în spic din diferite germoplasme de grâu. În studiul nostru nu am evidențiat polimorfism între formele parentale Boema (B) și F000628-G34 (F).
- Analize moleculare efectuate pentru gena *TaMyb10*, cu rol în culoarea boabelor dar și în toleranța la încolțirea în spic, nu au evidențiat polimorfism în studiul nostru.
- În această fază, în cadrul studiului nostru cu privire la toleranța grâului la încolțirea boabelor în spic, am inițiat analiza unor elemente genetice/moleculare implicate în reglarea echilibrului hormonal ABA/GA și a tranziției semințelor între dormanță și germinare ca **SnRK2** cât și a unor elemente genetice implicate în morfologia boabelor la grâu dar și în arhitectura spicului precum **gena Q** ce codifică un factor de transcriere APETALA2 (AP2).

Cristina, D., Ciuca, M., Mandeia, V. and Cornea, C.P., 2022. *Assessment of 25 genes reported to influence thousand grain weight in winter wheat germplasm*. Cereal Research Communications, 50(2), pp.237-243. WOS:000648370700001.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s42976-021-00170-0>

Cristina, D., Turcu, A.G., Conțescu, E.L., Marinciu, C.M., Șerban, G., Ciucă M. (2022). *Detectarea variantelor alelice ale genei NAM-A1 într-o colecție de genotipuri de grâu de toamnă obținute la INCDA Fundulea*. AN. INCDA Fundulea, Vol. XC, pag. 101-109. Electronic ISSN 2067-7758. <https://www.incda-fundulea.ro/anale/90/90.18.pdf>

Daniel CRISTINA, Alina-Gabriela TURCU, Cristina-Mihaela MARINCIU, Gabriela SERBAN, Indira GALIT, Elena-Laura CONTESCU, Vasile MANDEA, Matilda CIUCA, 2021. *DNA MARKERS-ASSISTED SELECTION TO PYRAMID RUST RESISTANCE GENES IN WHEAT BREEDING LINES*. Lucrări științifice, Seria agronomie, vol. 64, nr. 1 (pp. 15-20).

Ciucă, M., Turcu, A.G., Conțescu, E.L. and Cristina, D., 2020. Metodă adecvată pentru extracția de ADN din semințe și frunze pentru studii genetice la grâu (*Triticum aestivum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) și ardei (*Capsicum annuum*). An. INCDA Fundulea, 88, pp.165-177.





Ministry of Education



Iasi University of Life
Sciences (IULS)



Faculty of Agriculture



The Academy of
Agricultural and
Forestry Sciences



"LIFE SCIENCES TODAY FOR TOMORROW"

International Congress

21st-22nd October 2021, Iași, ROMANIA

**CONFERENCE OF AGRICULTURE AND FOOD ENGINEERING
FACULTY OF AGRICULTURE**

DIPLOMA

for the best scientific paper of the conference section

AGRICULTURAL TECHNOLOGIES

entitled

*DNA markers-assisted selection to pyramid rust resistance genes
in wheat breeding lines*

is hereby awarded to

**DANIEL Cristina, TURCU Alina-Gabriela, MARINCIU Cristina-Mihaela, ȘERBAN Gabriela,
CONTESCU Elena-Laura, MANDEA Vasile, CIUCĂ Matilda**

Dean

PhD. Assoc. Prof. Denis TOPA



Vice-Dean for scientific research activities

PhD, Assoc. Prof. Florin LIPȘA