

Markeri moleculari asociați rezistenței la secetă și arșiță, prezenți în programele de ameliorare a grâului de la INCDA Fundulea

Molecular markers associated with drought and heat resistance, used in wheat breeding programs at NARDI Fundulea

Daniel Cristina¹, Vasile Manda¹, Cristina-Mihaela Marinciu¹,
Alina-Gabriela Turcu¹, Elena-Laura Coțescu¹, Matilda Ciucă¹

Abstract

The forecasted climate changes will increase the effects of drought and heat on wheat crop. Consequently, resistance or tolerance to water stress and high temperatures constitutes a major objective of numerous wheat breeding programs. Marker assisted selection can facilitate the use of the many genes involved.

This paper presents the results of analyses on genotypes from different stages of the breeding program from NARDI Fundulea, for 7 markers associated with genes *Or*, *1-FEH w3*, *Dreb-B1*, *TaDRO-5A*, *TaPPH-7A*, *QTL qDSI.4B.1* and *TaBAS1-B1*. From the 133 analyzed wheat genotypes, 71 had favorable alleles of at least one of the markers associated with the plant response to drought and heat. The frequency of favorable alleles varies greatly between markers, from 4 to 38%. Out of the 71 mentioned genotypes, 32 had favorable alleles for two markers and 25 (about 19% of the analyzed genotypes) cumulated favorable alleles for more than two of the analyzed markers. For most pairs of markers, the frequency of favorable alleles showed large deviations from the frequency expected based on the respective individual markers involved.

The obtained results could be due to the effects of phenotypic selection applied during the breeding process in the environment of Fundulea, characterized by frequent periods of drought and high temperatures or by the lack of favorable alleles in the initial germplasm used in the breeding program. The data obtained can be a basis for future research aiming the optimization of marker assisted selection for improving wheat performance under the forecasted climate changes.

Cuvinte cheie: grâu comun, secetă, arșiță, markeri moleculari, KASP.

Keywords: common wheat, drought, heat, molecular markers, KASP.

INTRODUCERE

Schimbările climatice reprezintă o amenințare majoră pentru majoritatea culturilor agricole pe plan mondial. Seceta este una din consecințele schimbărilor climatice cu impact major asupra creșterii plantelor și asupra producției. Ameliorarea toleranței la stresul hidric

¹ INCDA Fundulea. E-mail: mcincda@gmail.com

Tehnoredactare: Elisabeta BARBU, Cătălin SAVIN

este o provocare importantă pentru cercetătorii care lucrează asupra culturilor de grâu. Și în România schimbările climatice, din ultimii ani, au condus la o variație mare atât a cantității totale de precipitații de la un an la altul cât și a distribuției acestora pe parcursul anului, inclusiv pe perioada vegetație a culturii cerealelor de toamnă. Popescu și colab. (2023) au sintetizat principalele efecte ale schimbărilor climatice în România, arătând că ele s-au manifestat prin temperaturi crescute ale aerului și arșițe pe perioade mai lungi de timp, secete severe în multe regiuni și secetă pedologică pe suprafețe însemnate situate în Sudul, Estul și Sud-Estul țării.

Grâul folosește diverse mecanisme pentru a supraviețui factorilor de stres hidric și termic, care includ ajustarea osmotică, protecția enzimatică, stabilitatea membranelor plasmactice, înlăturarea radicalilor liberi toxici, remobilizarea carbohidraților solubili în apă din tulpină pentru umplerea boabelor în condiții de stres hidric, arhitectura rădăcinilor etc.

Toate aceste însușiri sunt luate în considerație în programele de ameliorare care vizează îmbunătățirea comportării grâului în condiții de stres abiotic.

Selecția asistată de markeri (MAS) poate fi folosită pentru a facilita utilizarea în ameliorare a unor gene sau factori de transcripție în scopul creșterii rezistenței la secetă (Paudel și colab., 2024). De exemplu, Jain și colab. (2014) au folosit markeri moleculari pentru a selecta QTL asociați cu caractere implicate în rezistența la stres hidric și termic, precum temperatura lanului, conținutul de clorofilă, indicele NDVI, sau durata umplerii boabelor (GFD). Ciucă și Petcu (2009) au propus un marker SSR pentru facilitarea utilizării în ameliorare a genei care controlează reglarea osmotică la grâu, identificată de Morgan în 1991.

Rasheed și colab. (2016) au proiectat markeri KASP pentru două gene importante pentru controlul rezistenței la secetă *Dreb-B1* și *1-Feh w3*, ceea ce face ca metodologia KASP să fie recomandabilă pentru utilizare în ameliorare. Cercetări ulterioare au dus la proiectarea de markeri KASP pentru multe alte gene implicate în rezistența grâului la stres hidric sau termic, cum sunt *TaDRO-5A* (Zhang și colab., 2018), *TaPPH-7A* (Ur Rehman și colab., 2021), *Dreb-B1* (Khalid și colab., 2019), *QTL qDSI.4B* - De106 (Liu și colab., 2023) etc.

Prezenta lucrare sintetizează rezultatele analizelor moleculare privind prezența alelelor favorabile pentru 7 markeri moleculari asociați cu rezistența grâului la secetă, la 133 genotipuri din programul de ameliorarea grâului de la INCDA Fundulea.

MATERIAL ȘI METODE

Au fost analizate probe recoltate în anul 2025 din diferite verigi ale programului de ameliorarea grâului de la INCDA Fundulea. Toate probele au aparținut speciei *Triticum aestivum*.

Au fost analizați 7 markeri, corespunzători unor gene care controlează diferite elemente ale rezistenței la stres abiotic și localizate pe diferiți cromozomi:

- *Gena Or* implicată în controlul reglării osmotice, cu localizare pe cromozomul 7A (Morgan, 1991);
- *Gena 1-FEH w3*, care controlează enzima fructan 1-exohidrolaza w3, implicată în remobilizarea carbohidraților solubili în apă din tulpină, cu localizare pe cromozomul 6A;
- *Gena Dreb-B1*, implicată în sinteza unui factor de transcripție care reglează expresia mai multor gene induse de stres, cu localizare pe cromozomul 3B (Khalid și colab., 2019);
- *Gena TaDRO-5A*, implicată în determinarea arhitecturii radiculare, cu localizare pe cromozomul 5A (Zhang și colab. 2018);
- *Gena TaPPH-7A*, implicată în senescența frunzelor, situată pe cromozomul 7A (Wang et al., 2019);
- *Gena TaBAS1-B1*, implicată în sinteza unei peroxidaze cu rol în protecția clorofilei la factorii de stres abiotici, cu localizare pe cromozomul 1B (Zhu și colab., 2016);
- *qDSI.4B*, un *QTL*, major asociat cu toleranța la secetă, cu localizare pe brațul scurt al cromozomului 4B (Liu și colab., 2023).

Pentru gena *Or* s-au folosit markerii SSR raportați anterior *wmc603* și *wmc596*, folosind protocolul descris de Ciucă M. și Petcu E. (2009). Alături de aceștia s-a folosit și un al treilea marker SSR, numit “*secv603*”, cât și un marker KASP dezvoltat ulterior la INCDA Fundulea.

Pentru genele *Dreb-B1* și *1-Feh w3* s-au folosit markerii KASP propuși de Rasheed și colab. (2016), iar pentru celelalte gene, markeri KASP publicați anterior (Zhang și colab., 2021; Ur Rehman și colab., 2021; Khalid și colab., 2019; Liu și colab., 2023), sau dezvoltați la INCDA Fundulea.

A fost calculată frecvența alelelor favorabile pentru fiecare marker și combinație de markeri.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Dintre cele 133 genotipuri de grâu analizate, 71 au avut alele favorabile pentru cel puțin unul din markerii asociați cu comportarea plantelor la seceta și arșiță, ceea ce sugerează că selecția fenotipică efectuată în condițiile de la Fundulea a favorizat prezenta acestora.

Astfel, pentru reglarea osmotică analizele au evidențiat 26 (cca. 19%) dintre genotipurile de grâu cu profile electroforetice similare cu cele ale soiului Izvor, adică posedând alela *Or* ce conferă toleranță la secetă, confirmată de toți cei trei markeri utilizați (figura 1).

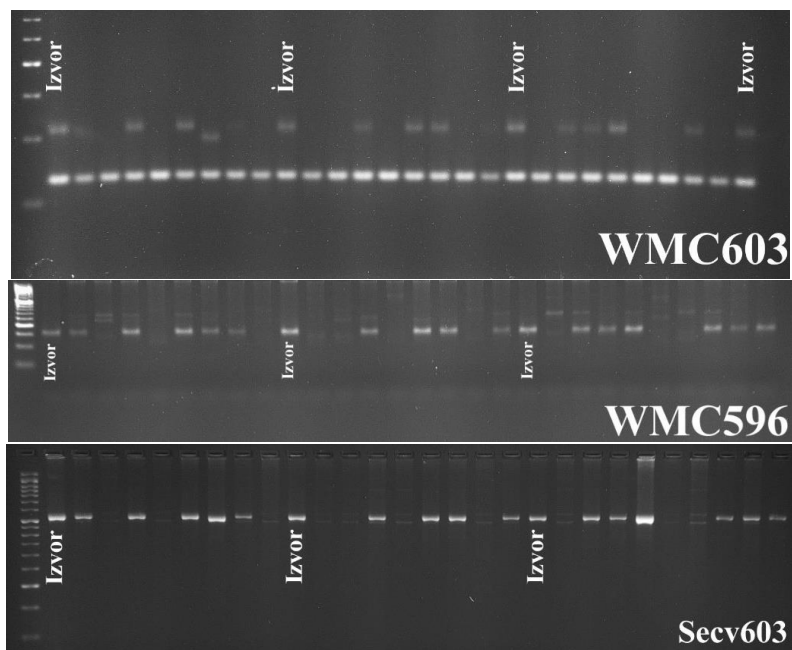


Figura 1 – Exemple de profile electroforetice obținute cu markerii wmc603, wmc596 și secv603, asociați cu reglarea osmotică la grâu.

(Examples of electrophoretic profiles obtained with markers wmc603, wmc596, and secv603, associated with osmotic regulation in wheat)

Analizele moleculare efectuate pentru gena *1-Feh w3*, care controlează sinteza enzimei fructan 1-exohidrolaza w3 și care poate contribui la creșterea producției grâului în condiții de stres hidric prin remobilizarea asimilatelor din tulpină pentru umplerea boabelor, alela favorabilă a fost identificată la 27 (cca. 20%) din genotipurile analizate (figura 2).

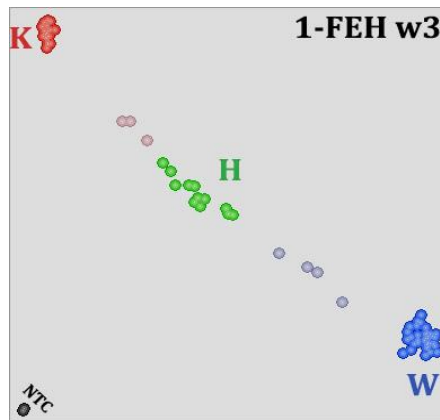


Figura 2 – Gruparea genotipurilor analizate prin tehnica KASP pentru locusul **1-Feh w3**
(Clustering of the analyzed genotypes using the KASP technique for the **1-Feh w3** locus)

Pentru gena **DREB-B1** (*“dehydration responsive element binding”*) care reglează expresia mai multor gene induse de stres, în mare parte într-o manieră independentă de ABA (acidul abscisic) și care joacă un rol critic în îmbunătățirea toleranței la stresul abiotic al plantelor (Lata. și Prasad, 2011), au fost identificate numai 6 genotipuri (cca. 4%) purtătoare ale alelei favorabile (figura 3).

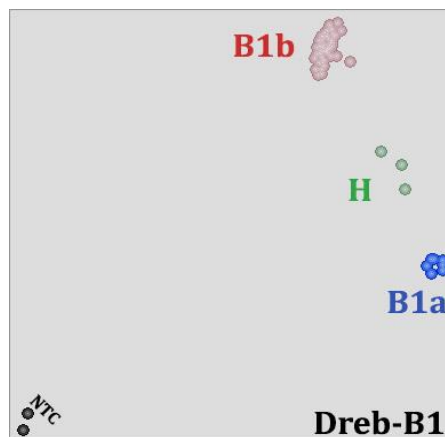


Figura 3 – Gruparea genotipurilor analizate prin tehnica KASP pentru locusul **Dreb-B1**
(Clustering of the analyzed genotypes using the KASP technique for **Dreb-B1** locus)

Pentru gena **TaDRO-5A** implicată în arhitectura radiculară, inclusiv în determinarea unghiului de creștere a rădăcinilor, care influențează modul în care rădăcinile explorează solul, alela favorabilă (A) a fost găsită la 44 (cca. 33%) din genotipurile analizate (figura 4). Frecvența ridicată a alelei implicate în arhitectura sistemului radicular sugerează că selecția fenotipică exercitată la Fundulea a fost legată în mare măsură de caracteristicile rădăcinilor.

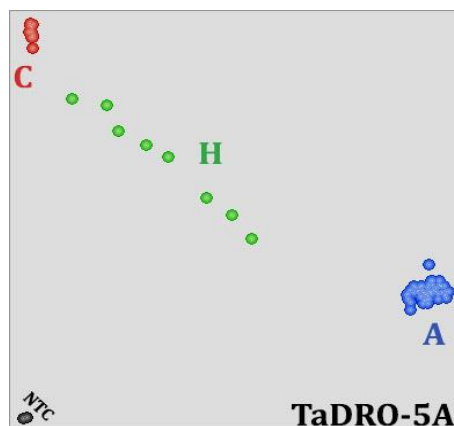


Figura 4– Gruparea genotipurilor analizate prin tehnica KASP pentru locusul *TaDRO-5A*
(Clustering of the analyzed genotypes using the KASP technique for *TaDRO-5A* locus)

Alela favorabilă (A) pentru markerul asociat genei *TaPPH-7A*, care codifică feofitinaza (PPH), o hidrolază ce degradează clorofila în procesul de senescență a frunzelor, a fost identificată la 25 (cca 19%) din genotipurile analizate (Figura 5). Frecvența destul de ridicată a alelei favorabile pentru acest marker sugerează că și presiunea de selecție pentru senescență întârziată a fost destul de puternică.

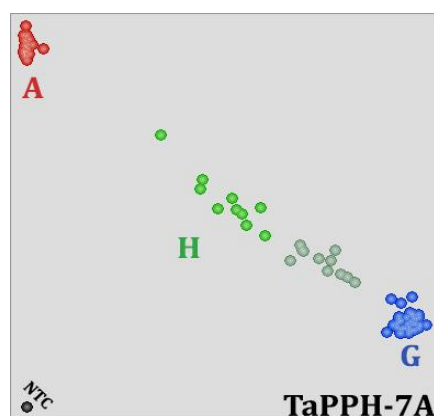


Figura 5 – Gruparea genotipurilor analizate prin tehnica KASP pentru gena *TaPPH-7A*
(Clustering of the analyzed genotypes using the KASP technique for *TaPPH-7A* gene)

Analizele efectuate pentru *QTL qDSI.4B.1* s-au realizat cu markerul DE106 (Liu și colab., 2023). Alela favorabilă (A) a fost prezentă în numai 6 (cca. 4%) din genotipurile analizate (figura 6).

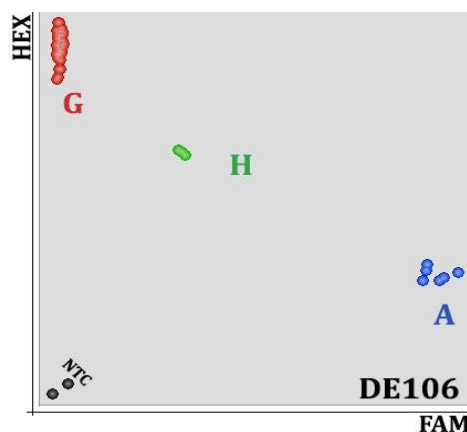


Figura 6 – Gruparea genotipurilor analizate prin tehnica KASP pentru markerul **DE106**
(Clustering of the analyzed genotypes using the KASP technique for **DE106** marker)

O frecvență redusă a alelei favorabile, de cca. 6% din totalul genotipurilor analizat, s-a constatat și pentru markerul corespunzător genei **TaBAS1**, implicată în sinteza unei peroxidaze cu rol în protecția clorofilei la factorii de stres abiotici (Zhu și colab., 2016).

Diferențele considerabile observate între markerii analizați în privința frecvenței alelelor favorabile pot fi datorate fie efectului selecției fenotipice asupra producției în condițiile de la Fundulea, caracterizate frecvent prin perioade de secetă și temperaturi ridicate, fie folosirii în programul de ameliorare a unei germoplasme inițiale în care alelele respective erau absente. Cercetări viitoare vizând efectul fenotipic al markerilor și analiza unui număr mai mare de genotipuri, incluzând diferitele surse de gene folosite în programul de ameliorare vor putea estima ponderea factorilor care au determinat diferențele constatate în privința frecvenței alelelor favorabile.

Figura 7 prezintă frecvența alelelor favorabile pentru fiecare din cei 7 markeri analizați și pentru toate perechile de markeri. Se constată o mare variabilitate, atât pentru markerii individuali (între 4 și 38%), cât și între perechile de markeri (între 0 și 24%). Pentru majoritatea perechilor de markeri, frecvența alelelor favorabile se abate mult de la cea așteptată pe baza frecvenței observate la markerii individuali respectivi. Având în vedere că markerii analizați au fost localizați pe cromozomi diferiți, ceea ce exclude înlănțuirea genelor respective, rezultatele sugerează că selecția fenotipică efectuată pe parcursul procesului de ameliorare a favorizat sau defavorizat asocierea unor markeri.

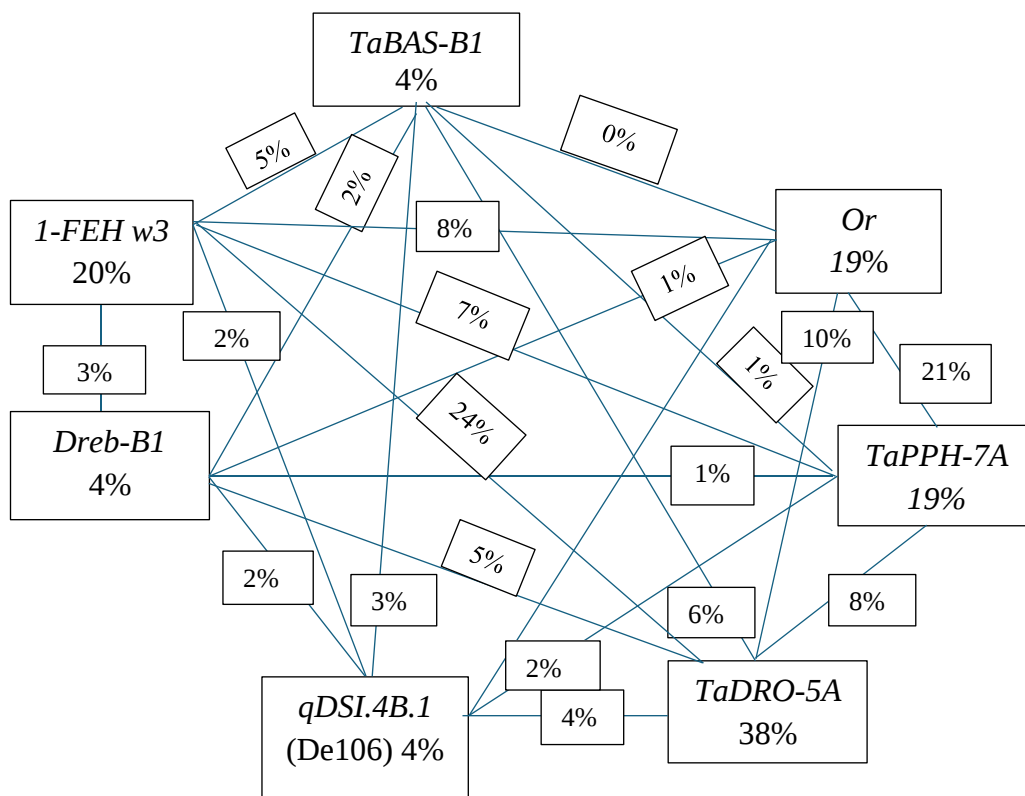


Figura 7 – Frecvența alelelor favorabile pentru cei 7 markeri analizați și pentru toate perechile de câte doi markeri

(Frequency of favorable alleles for the 7 analyzed markers and for all pairwise combinations of the markers)

Un număr de 25 genotipuri, adică cca. 19% din totalul genotipurilor analizate, au cumulat alele favorabile pentru mai mult de 2 dintre markerii analizați (tabelul 1). De exemplu, liniile GDD3-10 și GDD3-12 au cumulat alelele favorabile pentru markerii *TaBAS1-B1*, *1FEH w3*, *Dreb-B1*, *qDSI.4B.1* (De106) și *TaDRO-5A*, iar liniile GDD9-7, GDD9-14, GDD10-7 și GDD10-16 au cumulat alelele favorabile ale markerilor *1-FEH w3*, *TaDRO-5A*, or (*Or603-KASP*) și *TaPPH-7A*. Cercetări viitoare ar trebui să analizeze efectul fenotipic al acumulării de alele favorabile asupra performanțelor genotipurilor de grâu în condiții de stres hidric și/sau termic și să stabilească haplotipurilor optime pentru condițiile de stres întâlnite în România.

Rezultatele prezentate în lucrarea de față reprezintă un prim pas în direcția selecției asistate de markeri pentru îmbunătățirea comportării viitoarelor soiuri de grâu în condițiile de secetă și arșiță prognozate pentru țara noastră.

Tabelul 1

Genotipuri care au acumulat alele favorabile pentru mai mult de 2 markeri asociați rezistenței
la secetă și/sau arșiță
(Genotypes that accumulated favorable alleles for more than 2 markers associated with drought and/or
heat resistance)

Nr.crt. 2025	TaBAS-B1	1-FEH w3	Dreb-B1	qDSI.4B.1 De106	TaDRO-5A	Or603 KASP	TaPPH-7A
GGEN-28	B1a	H?	B1b	A		-	A
GGEN-29	B1b	K	B1b	A		-	A
GGEN-30	H	W	B1b	H		-	A
GGEN-32	B1b	K	B1a	G	C	-	A
GGEN-33	B1b	W	B1b	G	C	+	A
GGEN-34	B1b	K	B1b	G	A	+	G
GGEN-35	B1b	K	B1b	G	A	+	A
GGEN-36	H	K	B1a	G	A	+	A
GGEN-37	B1b	K	B1b	G	A	H?/-	H
GC01-4	B1b	K	B1b	G	A	+	A
GC01-7	B1b	W	B1b	G	A	-	G
GC01-8	B1b	W	B1b	G	A	+	A
GC01-24	B1b	W	B1b	G	A	+	A
GC01-25	B1a	W	B1b	G	A	H	H
GDD2-23	B1b	W	B1b	G	C	+	A
GDD3-10	B1a	W	B1a	A	A	-	G
GDD3-12	B1a	W	B1a	A	A	-	G
GDD3-16	B1b	H	B1b	G	A	+	A
GDD4-2	B1a	K	B1b	G	A	-	G
GDD9-7	B1b	W	B1b	G	A	+	A
GDD9-14	B1b	W	B1b	G	H	+	A
GDD10-7	B1b	W	B1b	H	A	+	A
GDD10-16	B1b	H	B1b	G	A	+	A
GDD10-19	B1b	H?	B1b	A	A	-	G
GDD10-22	B1b	H?	B1b	A	A	H	H

CONCLUZII

- Analiza a 133 genotipuri din programul de ameliorarea grâului de la INCDA Fundulea, utilizând 7 markeri asociați genelor *Or*, *1-FEH w3*, *Dreb-B1*, *TaDRO-5A*, *TaPPH-7A*, *QTL qDSI.4B.1 (De106)* și *TaBAS1-B1*, implicate în controlul unor însușiri care determină comportarea plantelor la secetă și/sau arșiță, a evidențiat prezența alelelor favorabile pentru cel puțin unul din markeri la 71 genotipuri, dintre care 32 genotipuri au prezentat alele favorabile pentru doi markeri, iar 25 genotipuri, adică cca. 19% din totalul genotipurilor analizate, au acumulat alele favorabile pentru mai mult de 2 dintre markerii analizați;

- Frecvența alelelor favorabile a variat mult între markeri (de la 4 la 38%), cât și între perechile de markeri (de la 0 la 24%);
- Pentru majoritatea perechilor de markeri, frecvența alelelor favorabile a prezentat abateri mari de la cea așteptată pe baza frecvenței observate la markerii individuali respectivi;
- Rezultatele obținute pot fi datorate fie efectului selecției fenotipice efectuate în procesul de ameliorare în condițiile de la Fundulea, caracterizate frecvent prin perioade de secetă și temperaturi ridicate, fie folosirii în programul de ameliorare a unei germoplasme inițiale în care alelele respective erau absente.

MULȚUMIRI

Sursa de finanțare: Acest studiu s-a realizat cu surse din bugetul proiectului PN23.18.02.01 (Ministerul Educației și Cercetării- Autoritatea Națională pentru Cercetare).

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- CIUCĂ, M., PETCU, E., 2009 – *SSR markers associated with membrane stability in wheat (Triticum aestivum L.)*. Romanian Agricultural Research, 26.pp.21-24.
- JAIN, N., SINGH, G. P., SINGH, P. K., RAMYA, P., KRISHNA, H., RAMYA, K. T., PRABHU, K. V., 2014 – *Molecular approaches for wheat improvement under drought and heat stress*. Indian J. Genet, 74(4), 578-583.
- KHALID, M., AFZAL, F., GUL, A., AMIR, R., SUBHANI, A., AHMED, Z., He, Z., 2019 – *Molecular characterization of 87 functional genes in wheat diversity panel and their association with phenotypes under well-watered and water-limited conditions*. Frontiers in plant science, 10, 717.
- LATA, C., & PRASAD, M., 2011 – *Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants*. Journal of experimental botany, 62(14), 4731-4748.
- LIU, G., LIU, D., ZHANG, A., LIU, H., MIA, M.S., MULLAN, D. and YAN, G., 2023 – *Identification of KASP markers and candidate genes for drought tolerance in wheat using 90K SNP array genotyping of near-isogenic lines targeting a 4BS quantitative trait locus*. Theoretical and Applied Genetics, 136(9), p.190.
- MORGAN, J. M. 1991 – *A gene controlling differences in osmoregulation in wheat*. Functional Plant Biology, 18(3), 249-257.
- PAUDEL, P., PANDEY, M. K., SUBEDI, M., PAUDEL, P., & KUMAR, R. 2024 – *Genomic approaches for improving drought tolerance in wheat (Triticum aestivum L.): A Comprehensive*. Plant Archives, 24(1), 1289-300.
- POPESCU, A., DINU, T. A., STOIAN, E., & ȘERBAN, V., 2023 – *Climate change and its impact on wheat, maize and sunflower yield in Romania in the period 2017-2021*. Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture & Rural Development, 23(1).
- RASHEED, A.; WEN, W.; GAO, F.; ZHAI, S.; JIN, H.; LIU, J.; GUO, Q.; ZHANG, Y.; DREISIGACKER, S.; XIA, X.; et al. 2016 – *Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat*. Theor. Appl. Genet. 2016, 129, 1843–1860.
- SALLAM, A., ALQUDAH, A. M., DAWOOD, M. F., BAENZIGER, P. S., & BÖRNER, A., 2019 – *Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research*. International journal of molecular sciences, 20(13), 3137.

- UR, REHMAN, S., ALI, SHER, M., SADDIQUE, M.A.B., ALI, Z., KHAN, M.A., MAO, X., IRSHAD, A., SAJJAD, M., IKRAM, R.M., NAEEM, M., and JING, R., 2021 – *Development and exploitation of KASP assays for genes underpinning drought tolerance among wheat cultivars from Pakistan*. *Frontiers in Genetics*, 12, p.684702.
- WANG, H., WANG, S., CHANG, X., HAO, C., SUN, D. AND JING, R., 2019 – *Identification of TaPPH-7A haplotypes and development of a molecular marker associated with important agronomic traits in common wheat*. *BMC plant biology*, 19(1), pp.1-12.
- ZHANG, W., LI, T., QIN, L., ZHAO, J., ZHAO, J., LIU, H., HOU, J., HAO, C., CHEN, D., WEI, Y. AND JIN, R., 2018 – *TaDRO, a gene associated with wheat root architectures, its global distribution and evolution in breeding*. *Scientia Agricultura Sinica*, 51(10), pp.1815-1829.
- ZHANG, W., ZHAO, J., HE, J., KANG, L., WANG, X., ZHANG, F., HAO, C., MA, X. AND CHEN, D., 2021 – *Functional gene assessment of bread wheat: breeding implications in Ningxia Province*. *BMC Plant Biology*, 21, pp.1-14.
- ZHU, X.F., ZHANG, H.P., HU, M.J., WU, Z.Y., JIANG, H., CAO, J.J., XIA, X.C., MA, C.X. AND CHANG, C., 2016 – *Cloning and characterization of Tabas1-B1 gene associated with flag leaf chlorophyll content and thousand-grain weight and development of a gene-specific marker in wheat*. *Molecular breeding*, 36, pp.1-12.