ADER 116
Etapa a II-a /2016

Utilizarea metodelor biotehnologice pentru creşterea variabilităţii genetice a materialului de ameliorare și accelerarea progresului genetic în privinţa nivelului şi stabilităţii recoltelor la principalele culturi agricole, în contextul schimbărilor climatice.

Ciuca Matilda
E-mail: mcincda@gmail.com

ADER 116/2016

Cod	PARTENERI (denumirea) :	Responsabilul proiectului în cadrul unităţii partenere (nume, prenume, funcţie)	Adresa de contact (e-mail, adresa poştală)
CP	Institutul Național de Cercetare – Dezvoltare Agricolă, Fundulea	CIUCA Matilda, CS I	mcincda@gmail.com, Str. Nicolae Titulescu; nr. 1; Loc. Fundulea; Jud. Călărași; cod 915200
P1	STAŢIUNEA DE CERCETARE – DEZVOLTARE AGRICOLĂ Turda (SCDA Turda)	RUSSU Florin, CS	russuflorin@yahoo.com, Turda, str. Agriculturii nr, 27, jud.Cluj CP 401100
P2	STATIUNEA DE CERCETARE DEZVOLTARE AGRICOLA PITESTI (SCDA Pitesti)	VOICA Maria, CS II	scda.pitesti@gmail.com, Soseaua Pitesti Slatina km. 5, com. Albota, jud. Arges 0742332308, voica_maria@yahoo.com.
P3	UNIVERSITATEA din Craiova-SCDA Caracal	IANCU Paula	office_scdacaracal@yahoo.com, paula.iancu76@gmail.com, Str. Vasile Alecsandri, Nr. 106, Caracal, jud. Craiova.
P4	STATIUNEA DE CERCETARE - DEZVOLTARE AGRICOLA SIMNIC	PĂUNESCU GABRIELA CS I	paunescucraiova@yahoo.com, Soseaua Bălcești nr.54, Simnicu de Jos Craiova, jud. Dolj

Faza:nr. II/2016. Creșterea eficientei metodelor biotehnologice abordate, în vederea obținerii de linii DH

- **Termen:01.11.2016**

OBIECTIVUL ETAPEI: *Creșterea eficientei metodelor biotehnologice abordate, în vederea obținerii de linii DH.*

- **Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului fazei:**
- - Metode îmbunătățite de lucru;
- - Identificarea preliminară de genotipuri cu rezistenţă îmbunătăţită;
- - Linii noi de preameliorare cu potenţial superior.

Activitati Etapa 2/2016

- **Activitate II.1**. Optimizarea parametrilor de lucru în vederea perfectionării metodelor de obținere a formelor dublu-haploide (DH) la grâu și orz (CP, P1) și testarea preliminară a unor markeri moleculari pentru detectarea de introgresii cu gene străine (CP);
- **Activitate II.2**. Testarea preliminară a unor linii DH mutante/recombinante și linii de introgresie, create anterior, pentru rezistenţa la stres termic, hidric şi la boli în condiţii controlate și cu markeri moleculari (CP) și în condiţiile specifice, zonale, ale centrelor participante (P1, P2, P3, P4);
- **Activitate II.3**. Noi hibridări cu folosirea liniilor evidențiate (CP, P1, P2, P3, P4), analiza parametrilor componenți ai eficienței producerii de haploizi la grâu, orz/orzoaică și triticale (CP, P1). Obținerea de noi amfiploizi prin regenerare *in vitro* de embrioni imaturi (CP) și realizarea dispozitivului experimental (CP, P1, P2, P3, P4).

REZULTATE

Homozigotarea materialului de ameliorare într-o singură generație prin haploidizare a devenit în ultima perioadă o metodă valoroasă în programele ameliorare şi în studii de genetică la multe specii de cultură. Producerea de haploizi şi de linii dublu haploide (tehnologia DH) la grâu, orz, triticale, respectiv de genotipuri complet homozigote într-o singură generaţie, cu combinaţii favorabile de gene fie ele dominante ori recesive, oferă un real avantaj în obținerea de progres genetic faţă de metodele clasice de ameliorare.

-Testarea de noi metode pentru eficientizarea tehnologiei DH:

a)-tratamente *„in vitro”* cu colchicină a embrionilor haploizi de grâu pentru dublarea numărului cromozomi (timpi de expunere și concentrați diferite)-mărirea numărului de semințe pe spic și plantă și reducerea perioadei de obținere a semințelor DH0.

b)-creșterea randamentului regenerării de plante din calusurile androgenetice la triticale prin folosirea a diferite medii de cultură

REZULTATE

Rezultate privind tratamentul de dublare a numărului de cromozomi în condiții „*in vitro*” la grâu

Genotip	F132		GP 614		GP 617		GP 618	
Concentratie %	0.035	0.05	0.035	0.05	0.035	0.05	0.035	0.05
Embrioni plasati pe mediu	34	29	10	10	25	20	21	29
Plante regenerate	9 (26.5%)	6 (20.7%)	0 (0%)	2 (20%)	8 (32%)	8 (40%)	13 (61.9%)	12 (41.4)

Genotipul GP614 a prezentat cea mai slaba capacitate de regenerare a plantulelor indiferent de concentrația colchicinei din mediu (factor de stres chimic). Totusi, la genotipul GP618, rata de regenerare a fost de 61.9% pe mediu de cultura cu 0,035% colchicina și de 41.4% la concentrația de 0.05%. La celelalte genotipuri rata de regenerare a fost mai scăzută: 26.5%; 0%; 32%.

Se impune continuarea testărilor pe mai multe genotipuri cu concentrații și timpi de expunere diferiți.

Eficiența producerii de haploizi la Triticale

Valorile procentuale (%) la 5 parametri ce caracterizează eficiența androgenezei la triticale (423 spice din seră) anul 2016.

Nr.Antere inoculate: 36635	Nr.Antere cu raspuns = 4724	Nr embrioni+ calus = 16838	Nr plante verzi=1001	Nr. plante albinotice = 1887	Nr. plante tratate = 319
AR/AC*100	E+C/AC*100	E+C/AR	P/E+C*100	PV/AC*100	PD/PV*100
12.9	45.9	3.56	5.9	2.7	32.4

1.AR/AC*100 = antere cu răspuns/ antere cultivate
2.E+C/AC*100 = embrioni+ calus/ antere cultivate
3.E+C/AR = embrioni+ calus/ antere cu răspuns
4.P/E+C*100 = plante/embrioni+calusuri
5.PD/PV*100 = plante tratate/plante verzi

Producerea de haploizi la grâu si orz/2016

Nr. combinații hibride de grâu-F1	Nr. Spice lucrate	Nr. total embrioni	Nr. Plăntuțe transplantate	Organogenezăă incompletă	Embrioni negerminați	Embrioni infectați
44	479	615	358	117	87	53

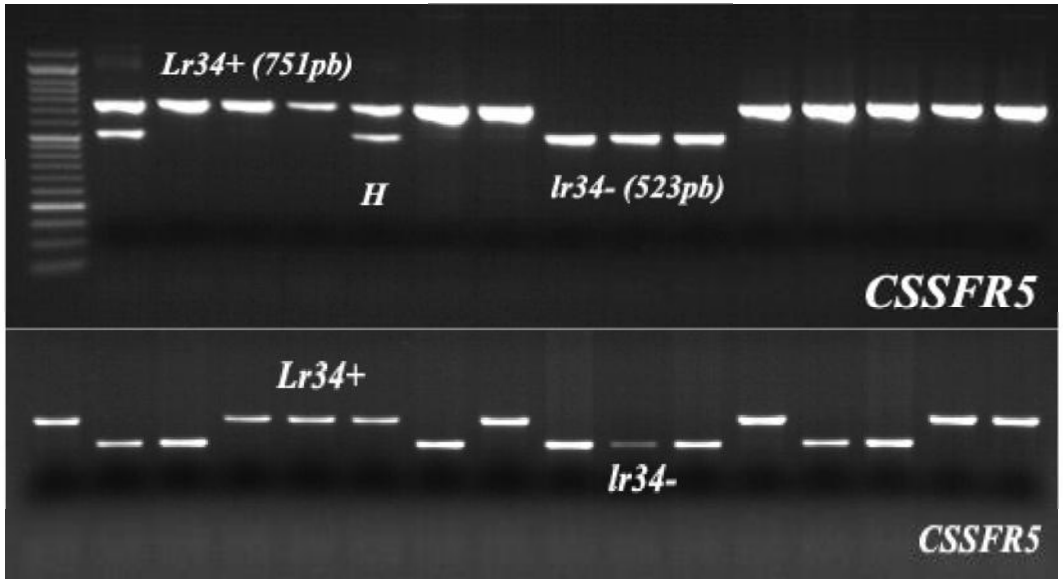
Nr. combinații orz-F1	Nr. Spice lucrate	Nr. total embrioni	Nr. Plăntuțe transplantate	Nr. plante pierite după transplantare	Nr. plante pierite după vernalizare	Nr. plante tratate cu colchicină
28	253	611	236	48	11	173

Rezultate analize moleculare

Rezultatele analizelor moleculare privind translocația grâu – secară 1AL.1RS și distribuția alelelor de la locusul *Lr34*.

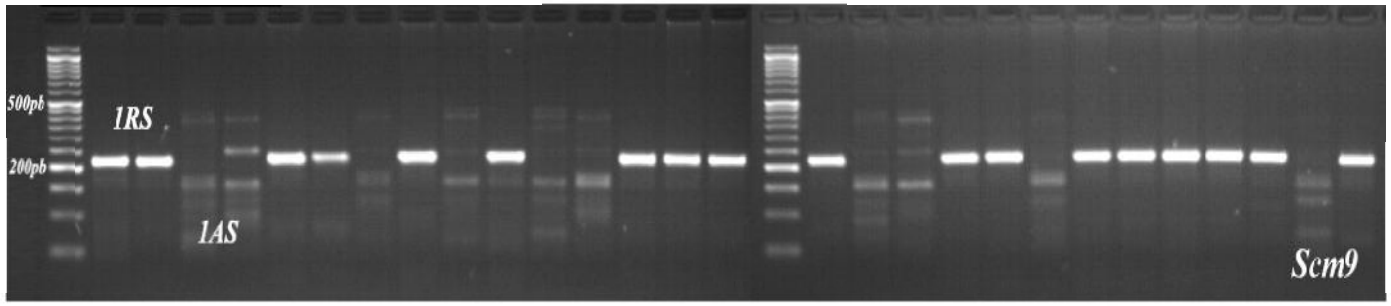
Total	1R	1R/Glu -A3	Lr34+	1R+Lr34	1R/Glu-A3+Lr34+	lr34-	H	n.a.
314	196	23	143	81	7	157	8	6
	62,40%	7,30%	45,50%	25,80%	2,23%	50%	2,50%	1,90%

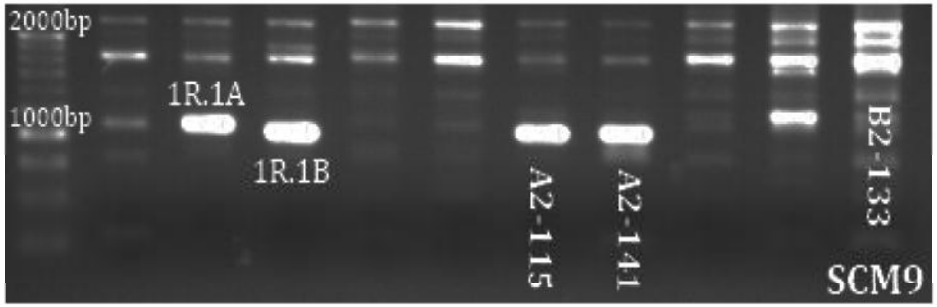
Rezultate analize moleculare



Profil electroforetic obținut cu markerul funcțional cssfr5

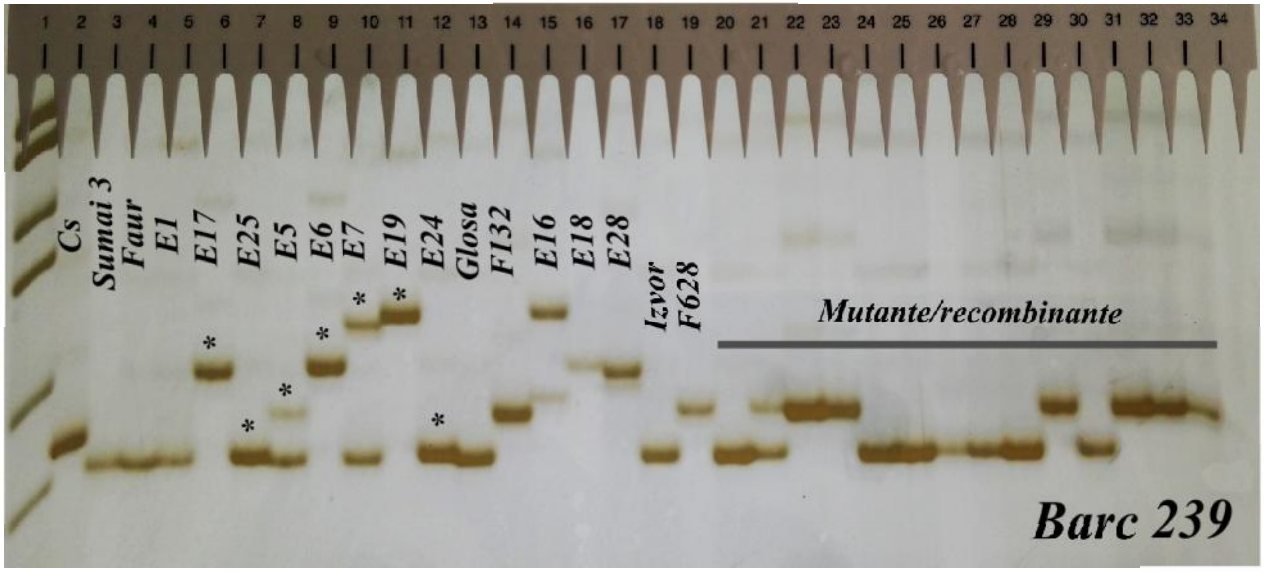
Rezultate analize moleculare





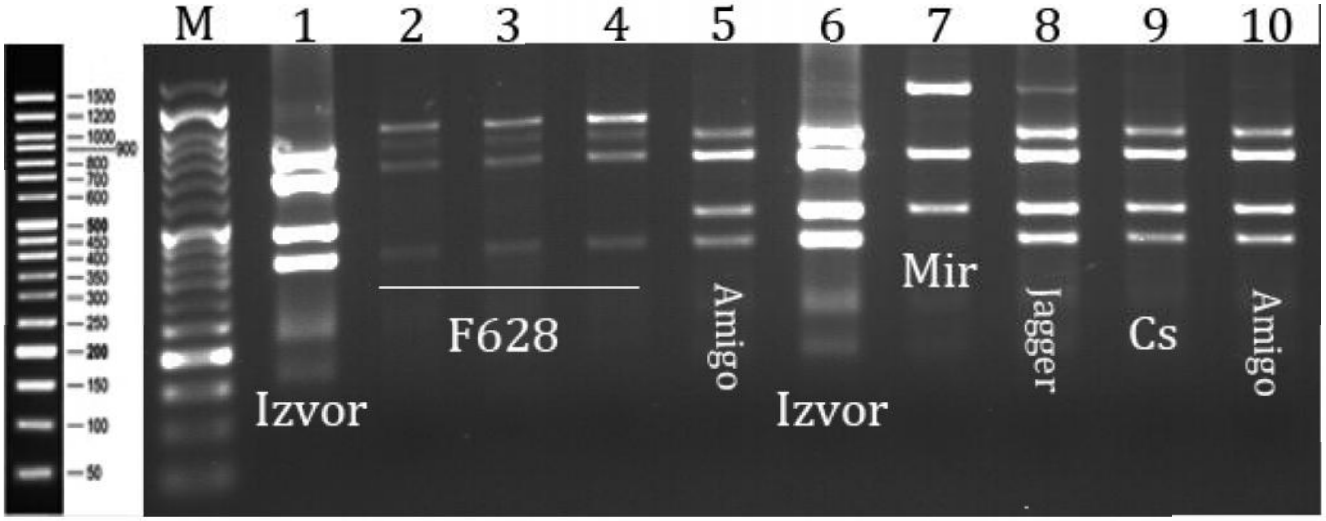
Profil electroforetic obținut cu markerul Scm9

Rezultate analize moleculare



Polimorfism la nivelul cromozomului 5D (amfiploizi sintetici și grâu comun)

Rezultate analize moleculare



Profil electroforetic pentru gena *6-SFT-A2* (nouă variantă alelică pentru F628)

Rezultate:

- Metodă de aplicarea tratamentului cu colchicină „in vitro”;
- Evidențierea mediului W14 de cultură pentru capacitate de calusare (androgeneză);
- Identificarea unei diversități genetice structurale pentru cromozomul 5D din amfiploizi sintetici (*T.durum/Ae.tauschii squarrosa*) față de cromozomul 5D de la grâul comun;
- Detectarea translocației grâu secară 1AL.1RS cu markerul SSR TSM106;
- Identificarea unei noi variante alelice la nivelul locusului *6-SFT-A2;*
- Evidențierea a 23 de genotipuri cu translocația 1R/Glu-A3 (7,3% din materialul analizat);
- Evidențierea a 7 genotipuri cu 1R/Glu-A3+Lr34+ (2,23%);
-Noi hibridări și înființarea câmpurilor experimentale pentru sezonul 2016-2017
- Caracterizarea morfometrică a materialului experimentat în sezonul 2015-2016 și selecția liniilor valoroase pentru zonele Turda, Caracal, Pitești și Șimnic.

Concluzii

-Activităţile și obiectivele prevăzute în cadrul fazei a 2-a proiectului s-au efectuat conform planului de realizare propus;

-S-au identificat linii cu potential genetic superior;

-Au fost testate metode îmbunătățite de obținere a liniilor DH;

Propuneri pentru continuarea proiectului

Rezultatele obţinute confirmă faptul că obiectivul fazei II/2016 şi toate activităţile din planul de realizare au fost îndeplinite. Se impune continuarea testărilor metodei de dublare "*in vitro*", metodă care ar permite scurtarea timpului necesar obținerii semințelor dublu haploide, precum și producerea mai multor semințe DH0 pe plantă. De asemenea, identificarea unui nou marker molecular (TSM106) pentru detectarea translocației 1AL.1RS (regiunea telomerică a brațului scurt al cromozomului 1R) permite studiul influenței acestei regiuni telomerice asupra elementelor de producție iar noul haplotip de la nivelul locusului genei *6-SFT-A2* (genotipul F000628G34-1) face posibilă efectuarea de noi studii privind influența acestuia asupra MMB-ului (greutatea a 1000 boabe).

De asemenea, rezultatele activităților din această fază de desfășurare a proiectului exemplificate prin extinderea bazei de variabilitate genetică argumentează continuarea finanțării proiectului în vederea obținerii și testării unui număr mai mare de linii DH mutante/recombinate, de amfiploizi sintetici și de linii elite extrase din populații sintetice de retro-încrucișare (amfiploizi x forme moderne de grâu comun), în vederea creării de noi linii de preameliorare și linii de introgresie cu gene utile transferate de la specii sălbatice, la grâul comun.

= 1pl
= 2pl
= 2 pl
W14
234
S2 = 4pl
C17
S1 = 2pl
S1 = 2pl
W14
238