



MINISTERUL AGRICULTURII
ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

ADER 3.2.1. Faza 3/2021



Accelerarea progresului genetic pentru rezistența sau toleranța la unii factori biotici și abiotici de mediu importanți pentru cultura grâului, prin elaborarea unor modalități de selecție timpurie cu ajutorul markerilor moleculari



ADER 3.2.1.

Proiect finanțat prin: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale

Tip proiect: Plan Sectorial 2019-2022 - ADER 2022

Acronim proiect: ADER 3.2.1.

Contract nr.: 321/17.09.2019

Autoritatea Contractantă: Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, Plan sectorial pentru cercetare-dezvoltare din domeniul agricol pe anii 2019-2022.

CONSORȚIU PROIECT

Contractor: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea

Director de proiect: Dr. Matilda Ciucă

Partener: Institutul de Biologie București al Academiei Române

Responsabil proiect: Dr. Florența-Elena Helepciuc

Faza 3/2021

Perioada de derulare: 01.11.2020-29.10.2021

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 (3.2): **Explorarea a noi căi de scurtare a perioadei de creare de soiuri.**

DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ

Faza: nr.3 - Detectarea unor componente structurale, celulare și moleculare pentru evitarea stresurilor biotice și abiotice la grâu.

Obiectivele fazei:

- (1) Caracterizarea moleculară a unui sortiment de linii/soiuri de grâu privind variantele alelice ale genelor *TaCOMT-3B* și *1-FEH w3*;
- (2) Studiul stratului ceros de la grâu cu ajutorul markerilor moleculari și a microscopiei electronice.

Activitățile proiectului ADER 3.2.1, faza 3/2021

Activitate 3.1. Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei *TaCOMT-3B*, implicată în biosinteza ligninei.

Activitate 3.2. Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei *1-FEH w3*, implicată în remobilizarea fructanilor din tulpină pentru umplerea boabelor în condiții de stres hidric.

Activitate 3.3. Analize moleculare privind variabilitatea genetică existentă la nivelul locilor implicați în sinteza stratului ceros la nivel epicuticular.

Activitate 3.4.

1. Optimizarea metodei de prelucrare a probelor pentru microscopia electronică în scopul evidențierii stratului ceros epicuticular.
2. Procesarea probelor conform metodologiei adecvate, vizualizarea acestora la microscopul electronic și prelucrarea datelor.

Activitate 3.5.

1. Noi hibridări; 2. Observații fenotipice în câmp; 3. Teste fiziologice privind toleranța la stresul abiotic a materialului biologic.

Activitate 3.6.

1. Diseminarea rezultatelor; 2. Selecție de linii valoroase privind toleranța la stresul hidric/termic/patogeni; 3. Realizarea dispozitivului experimental din câmp.

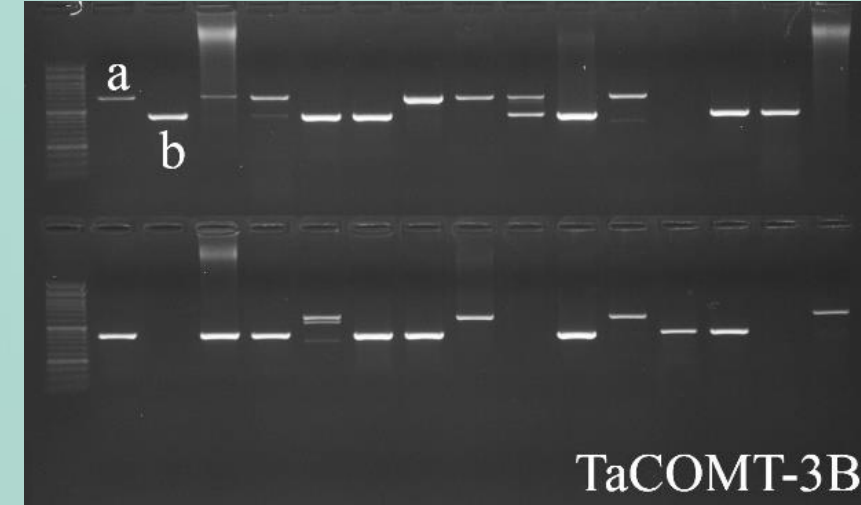
Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei *TaCOMT-3B*, implicată în biosinteza ligninei

Caracterizarea genelor *TaCOMT* și dezvoltarea markerilor specifici acestora ar putea permite selecția asistată de markeri în ameliorarea grâului. La grâu genele *TaCOMT* sunt situate pe cromozomii 3A, 3B și 3D (Fu L.P. și colab., 2019). La nivelul genei *TaCOMT* cu localizare pe cromozomul 3B au fost identificate două variante alelice, *TaCOMT-3Ba* și *TaCOMT-3Bb*, ce se diferențiază printr-o inserție/deleție (InDel) de 222-bp. Conținutul în lignină al soiurilor cu varianta alelică *TaCOMT-3Ba* a fost semnificativ mai mare decât al celor cu varianta *TaCOMT-3Bb* (Fu L.P. și colab., 2019).

În această fază au fost efectuate analize moleculare pentru toate cele trei gene *TaCOMT* din genomul grâului, pe un sortiment de 32 de soiuri de grâu. Analiza efectuată pentru *TaCOMT-3A* nu a evidențiat diferențe în cadrul materialului analizat.

În schimb, la nivelul genei *TaCOMT-3B*, pe materialul analizat în această etapă s-a observat polimorfism, evidențiindu-se cele două variante alelice, *TaCOMT-3Ba* printr-un produs de 638pb și *TaCOMT-3Bb* reprezentat de produsul mai mic de 416pb.

- varianta alelică care determină un conținut de lignină mai mare, *TaCOMT-3Ba*, s-a evidențiat în 41% dintre genotipurile analizate (13 probe prezintă acest haplotip din 32 analizate).

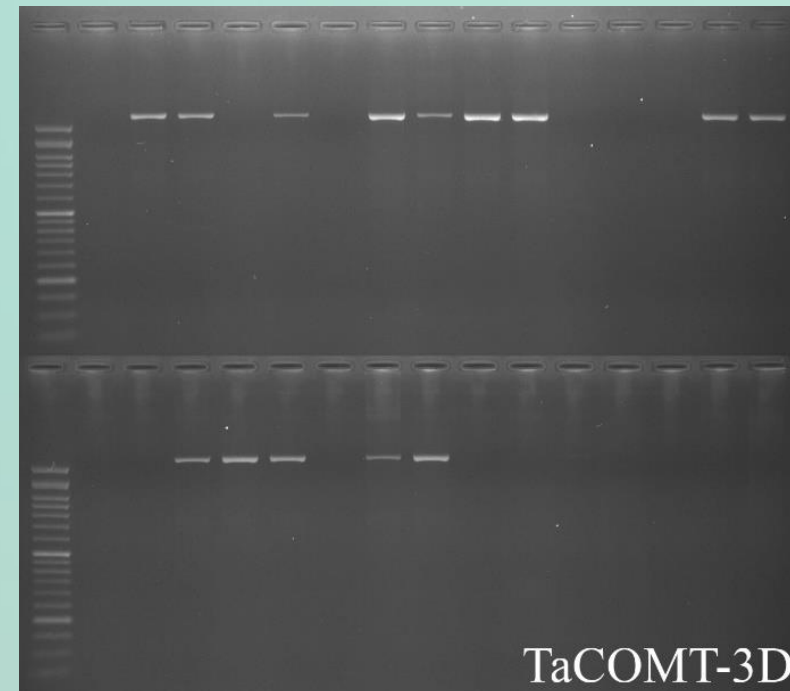


Nr.	Soi	TaCOMT 3B	TaCOMT 3D	Nr.	Soi	TaCOMT 3B	TaCOMT 3D
1	GLOSA	a	-	17	FUNDULEA 29	a	-
2	FUNDULEA 4	b	+	18	A15	a	+
3	BOEMA	b	+	19	PAJURA	a	+
4	RENEANSANSA	a	-	20	OTILIA	a	+
5	IZVOR	b	+	21	ARIESAN	a	-
6	PITAR	b	-	22	VOINIC	b	+
7	MIRANDA	b	+	23	ZAMFIRA	a	+
8	URSITA	b	+	24	AMURG	b	-
9	DROPIA	b	+	25	ALEX	b	-
10	ARMURA	a	+	26	FUNDULEA 133	a	+
11	AVENUE	na	-	27	LOVRIN 32	b	+
12	BEZOSTAIA	a	-	28	DOR	b	-
13	APACHE	b	-	29	BOGDANA	a	+
14	DACIA	b	+	30	SEMNAL	b	-
15	ABUNDENT	a	+	31	FAUR	na	+
16	IULIA	b	-	32	BALTAG	b	-

Analiza moleculară efectuată pentru evidențierea variantelor alelice de la nivelul locusului genei *TaCOMT-3D* a evidențiat doar prezența/absența unui produs de peste 1500pb. Acest rezultat, prin absența produsului de 1500pb în unele probe, sugerează absența acestui locus în materialele respective. Analiza efectuată a permis detectarea prezenței (“+”) acestui locus în 56% dintre genotipurile analizate.

Totodată, se poate observa că varianta *TaCOMT-3Ba* și prezența genei *TaCOMT-3D* au fost detectate doar în 8 soiuri, precum, Armura, Abundent, A15, Pajura, Otilia, Fundulea 133, Zamfira și Bogdana.

Deoarece soiul A15 se încadrează în această grupă și totuși este cunoscut ca sensibil la cădere, se poate spune că pentru rezistența la cădere trebuie avut în vedere și alți factori.



Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei *1-FEH w3*, implicată în remobilizarea fructanilor din tulpină pentru umplerea boabelor în condiții de stres hidric.

Carbohidrații solubili în apă („WSC”), reprezentați în special de glucoză, fructoză, zaharoză și fructani, acumulați în tulpină, în perioada de la alungirea tulpinii până la faza incipientă de umplere a boabelor, ar putea fi remobilizați în etapa ulterioară de dezvoltare a grâului, și anume faza de umplere a boabelor.

Redistribuirea WSC în timpul umplerii cerealelor poate contribui cu aproximativ 20% din greutatea finală a cerealelor în condiții favorabile (Wardlaw și Willenbrink, 2000), în timp ce WSC din tulpinii ar putea contribui cu aproximativ 50% din producția cerealelor atunci când culturile de grâu suferă din cauza stresului hidric în timpul perioadei de umplere a boabelor.

Gena 1-FEH w3 joacă un rol principal în remobilizarea WSC în timpul umplerii boabelor în condiții de stres hidric, și prezintă două alele, *K* și *W*. Zhang și colab., 2015 prezintă alela *W* identificată în soiul Westonia, drept alelă favorabilă.

Haplotipurile genei *1-FEH w3* și diferențele fenotipice

1-FEH w3	L (mm)	l (mm)	FFD	MMB(g)
K	6.50	3.28	1.85	39.3
W	6.50	3.16	1.83	37.5
K-W	0.00	0.11	0.02	1.83

Diferențele măsurătorilor (lungime - L, lățime boabe - l, masa a 1000 boabe - MMB și factorul formă densitate - FFD) dintre cele două haplotipuri au arătat că genotipurile cu haplotipul de tip K au media lățimii boabelor și media MMB mai mari decât genotipurile cu haplotip de tip W, cu diferențe de 0,11mm pentru lățime, respectiv 1,83g pentru MMB.

Analize moleculare pentru detectarea variantelor alelice de la locusul genei *1-FEH w3*, implicată în remobilizarea fructanilor din tulpină pentru umplerea boabelor în condiții de stres hidric.

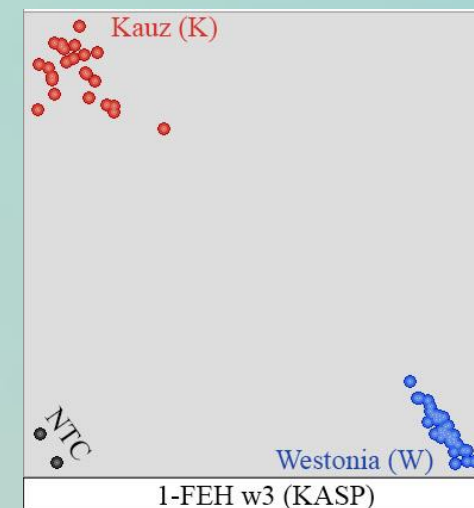
Analiza statistică privind asocierea *1-FEH w3* cu elemente de producție

Prin urmare, în acest studiu, s-a evidențiat ca fiind favorabilă varianta alelică *K* (Kauz). Din punct de vedere statistic (software TASSEL - General Linear Model) alela *K* a fost semnificativ asociată cu lățimea boabelor ($p < 0,05$)

Elemente de producție	p	marker_Rsq	Estimate
L	0.87238	0.000846	0.027
I	0.01649*	0.171760	0.114
FFD	0.72223	0.004130	0.015
MMB	0.15694	0.063560	1.947

Analizele de la nivelul locusului *1-FEH w3* efectuate și cu tehnica KASP au condus la obținerea unor clustere cu separare bună, diferențierea dintre cele două haplotipuri fiind clară și ușor de observat.

Analiza KASP s-a dovedit a fi o metoda rapidă, simplă și fiabilă pentru screeningul locusului *1-FEH w3*.



Rezultate fază III

Analize moleculare privind variabilitatea genetică existentă la nivelul locilor implicați în sinteza stratului ceros la nivel epicuticular.

Ceara epicuticulară servește ca o interfață între plante și mediul lor, oferind o barieră fizică în calea pierderii de apă non-stomatică, permițând ca schimbul de gaze și transpirația să fie controlate în mod dinamic de către stomate.

Prin urmare, acest strat de ceară este considerat a fi o metodă de adaptare cheie în timpul evoluției plantelor.

Funcția majoră a cerii epicuticulare este de a controla pierderile de apă non-stomatale dar afectează, de asemenea, interacțiunile plante-insecte și plante-microorganisme, protejează plantele de deteriorarea luminii ultraviolete sau a iradierii ridicate, a deteriorării mecanice și a altor stresuri abiotice și biotice.

Până în prezent, mai mulți loci care controlează glaucozitatea la grâu au fost localizați pe diverși cromozomi din grâu: locii *W1*, *W3* și *lw1* pe cromozomul 2BS; *W2* și *lw2* pe cromozomul 2DS; *W4* pe cromozomul 3DL; *W5* pe cromozomul 7DL; *lw3* pe cromozomul 1BS și *Ws* pe cromozomul 1AS.

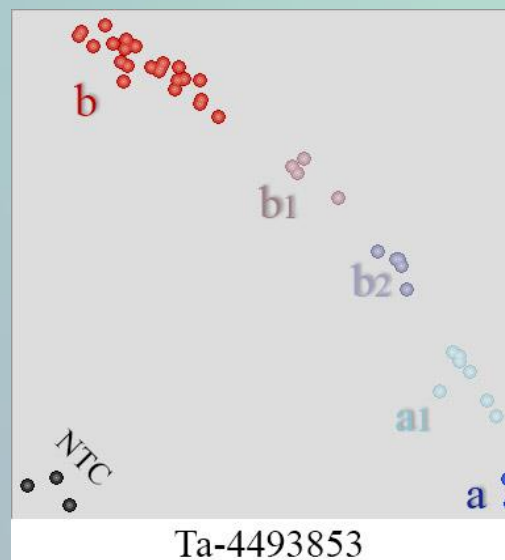
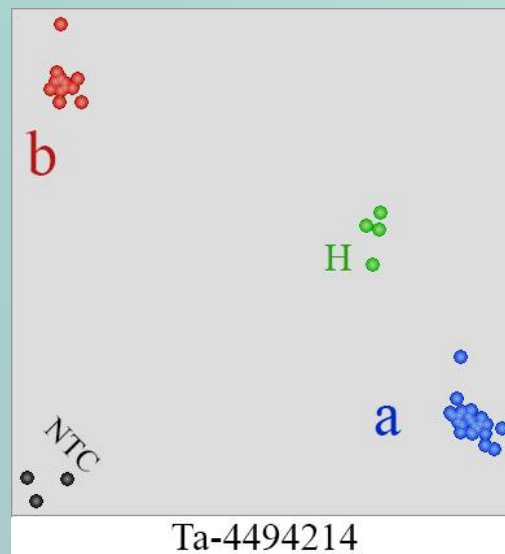


Aspecte din câmp: linia GGEN3 fără strat de pruină și linia GGEN4 la care se observă pelicula de culoare alb-albăstruie, specifică caracterului glaucozitate

Analize KASP la locusul W1 cu localizare pe cromozomul 2B

Analizele cu markerul KASP Ta-4494214 a condus la obținerea a 3 clustere (grupuri) de genotipuri cu softul KlusterCaller, notate cu a (22 genotipuri), b (10 genotipuri) și H pentru variantele posibil heterozigote sau un alt haplotip având în vedere faptul că markerul KASP a fost creat pe baza unei deleții de o singură nucleotidă și de asemenea originea materialului biologic din surse înrudite cu grâul (4 genotipuri). Grupul notat cu „a” reprezintă varianta alelică favorabilă, dată de prezența deleției nucleotidei G din secvență (conform studiului lui Würschum, T. și colab., 2020).

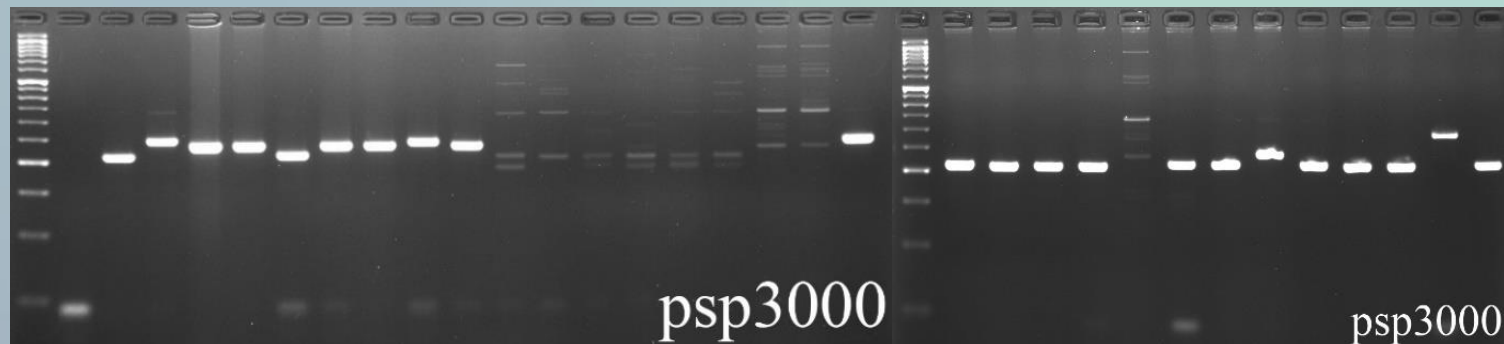
Markerul KASP Ta-4493853 a condus la obținerea a 5 grupuri de genotipuri după cum urmează: 2 genotipuri în grupul a, 7 în grupul a1, 22 în grupul b, 4 în grupul b1, și 6 în grupul b2. Aceste rezultate sugerează existența unor variante alelice diferite/noi. Pentru confirmarea acestor rezultate, analiza cu acest marker se va repeta și se va rescrie secvența primerilor.



Nr	Linie	Ta-4493853	Ta-4494214
1	IZV	b	b
2	F628	b	b
3	CS	b2	na
4	Glosa	b	na
5	Ariesan	a1	na
6	GGEN 3 NEC	b	b
7	GGEN 4	a1	a
8	GGEN 33	a1	a
9	GGEN 37	b	b
10	GGEN 65	b2	na
11	GGEN 69	a1	a
12	GGEN 73	a1	a
13	GGEN F	b2	a
14	SEC	b	na
15	GDR 1082	b	b
16	SP61	b	a
17	SP125	b	a
18	SP125*	b	a
19	21-1	b	a
20	21-2	b	a
21	21-4	b	a
22	22-2	b	a
23	H9G	a1	a
24	H22	b1	a
25	H49 POP	b	b
26	H9G*	a1	a
27	H49G	b2	a
28	H175	b	b
29	H254	b1	a
30	H255	b	b
31	613	b2	a
32	G557-2	b	h
33	G557-6	b	h
34	G557-6 (2)	b	a
35	574-6	a	a
36	516-1-I	b2	a
37	574-6*	a	a
38	CGF593	b	b
39	CGF595	b	b
40	GFU296	b1	h
41	GFU296*	b1	h

Rezultate fază III

Analizele moleculare pentru loci ce inhiba acțiunea locilor *W* au fost efectuate pentru locusul *lw3*, localizat pe cromozomul 1BS (Wang și colab., 2014) cu doi markeri Xpsp3000 și WL2282. Rezultatele obținute cu cei doi markeri fac distincție clară între GGEN3 (conținut scăzut de ceară) și GGEN4 (conținut ridicat de ceară). De asemenea, se observă un produs distinct pentru linia Bogdana observat doar în analiza cu markerul Xpsp3000.



Rezultate fază III

Optimizarea metodei de prelucrare a probelor pentru microscopia electronică în scopul evidențierii stratului ceros epicuticular.

Procesarea probelor conform metodologiei adecvate, vizualizarea acestora la microscopul electronic și prelucrarea datelor.

a. Microscopia electronică cu baleiaj (SEM)

Cristalele de ceară sunt dispuse sub formă de microstructuri complexe tridimensionale și pot avea forme variate, cele mai des întâlnite grupe fiind filme amorfe, granule, plăci, filamente, tuburi, panglici.

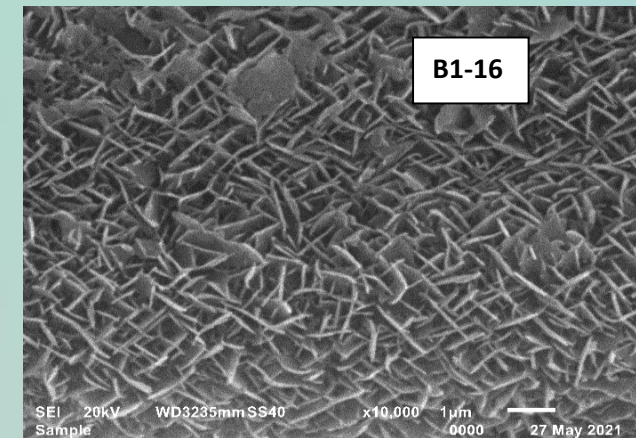
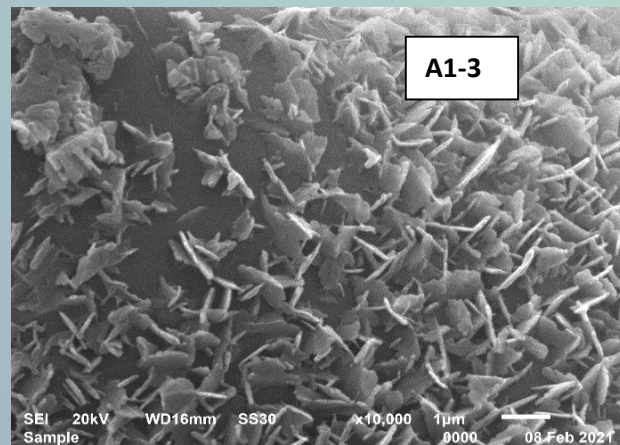
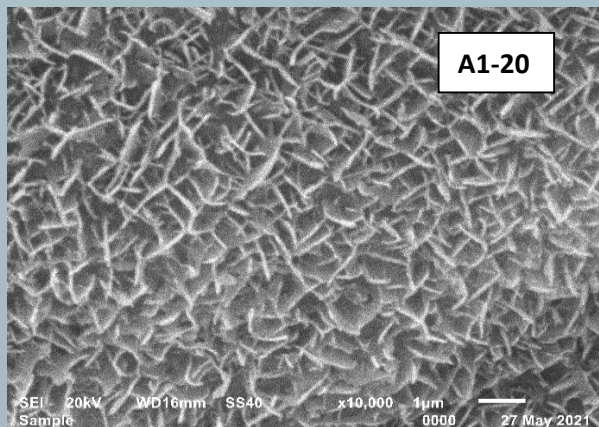
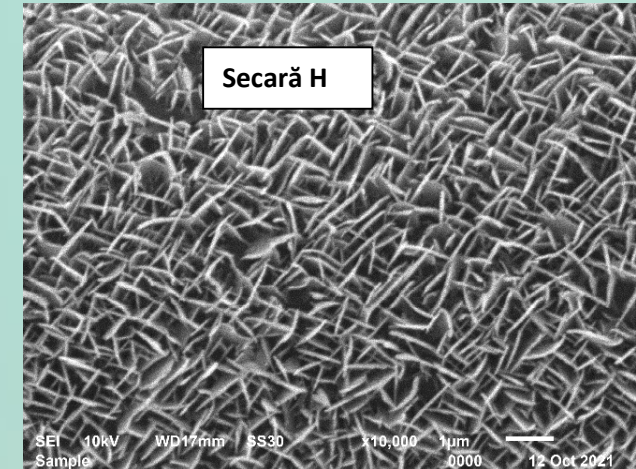
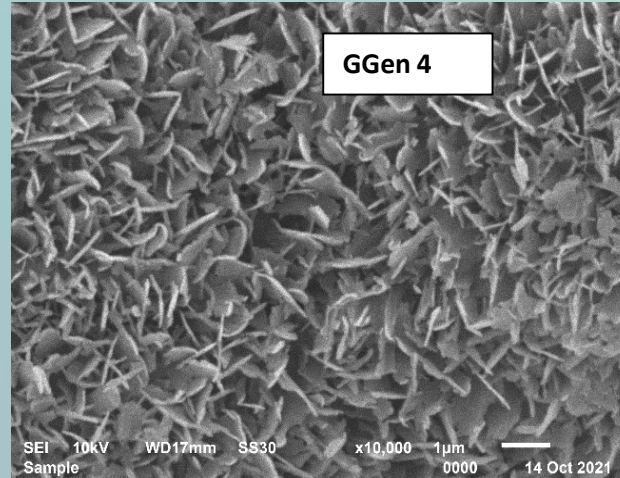
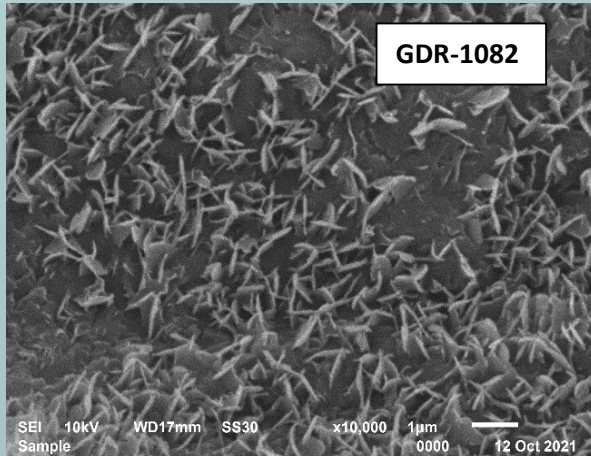
Frunza steag de la grâu prezintă de asemenea diferențe morfologice ale cristalelor de ceară epicuticulare pe cele două părți ale frunzei. Cristalele de pe partea adaxială au fost sub formă de plăci simple la GDR-1082, Giza 168, A1-65, A1-66, mixte cu plăci și tubuli la variantele F628, Izvor, A1-3, A2-92, A2-255, B1-16, mixte cu plăci și panglici la GGen 4 și A1-20 și mixte cu plăci, tubuli și panglici la variantele Bandă martor, Drysdale, A2-13 și secară Harkovskaia

Nr.	Soiul	Suprafața adaxială				Suprafața abaxială			
		plăci	tubuli	panglici	film amorf	plăci	tubuli	panglici	film amorf
1.	GDR-1082	x	-	-	-	x *	-	-	x
2.	Bandă martor S	x	x	x	-	x	x	-	-
3.	GGen4	x	-	x	-	-	x	-	-
4.	Drysdale	x	x	x	-	-	x	-	-
5.	Giza 168	x	-	-	-	x	x	-	-
6.	Izvor	x	-	-	-	x	x	-	-
7.	F628	x	x	-	-	-	x	-	-
8.	A1-3	x	x	-	-	-	x	-	-
9.	A1-20	x	-	x	-	x	x	-	-
10.	A1-65	x	-	-	-	-	x	-	-
11.	A1-66	x	-	-	-	x	x	-	-
12.	A2-13	x	x	x	-	-	x	-	-
13.	A2-92	x	x	-	-	-	x	-	-
14.	A2-255	x	x	-	-	-	x	-	-
15.	B1-16	x	x	-	-	-	x	-	-
16.	Secară Harkovskaia	x	x	x	-	-	x	-	-

Tipurile de cristale de ceară observate pe partea adaxială și abaxială la 16 genotipuri analizate (x reprezintă prezența morfologiei respective)

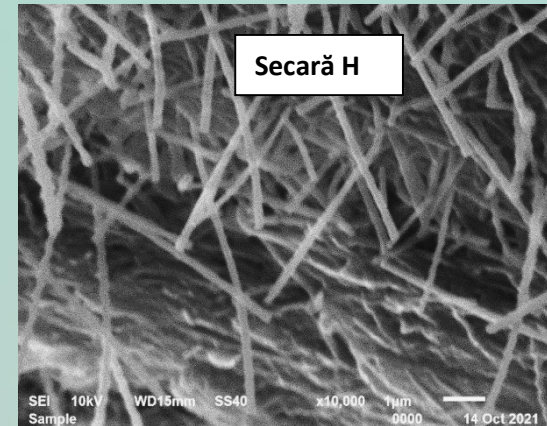
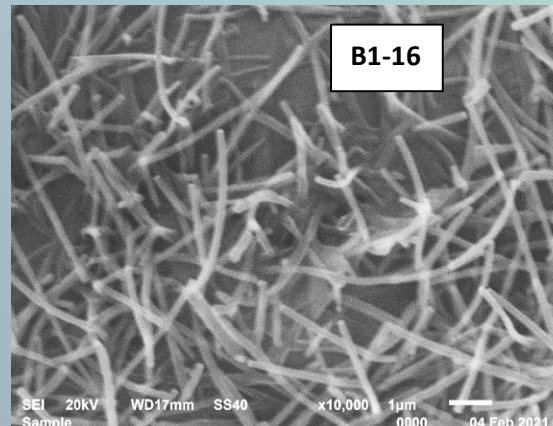
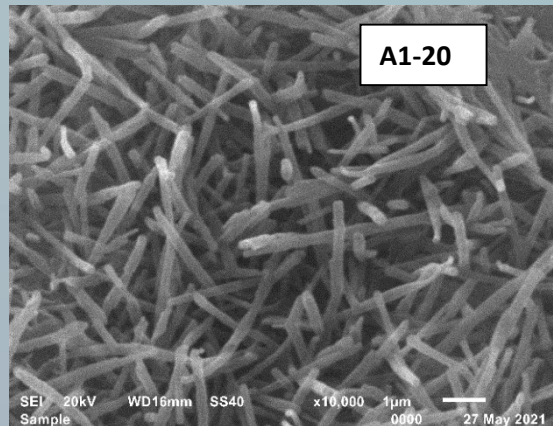
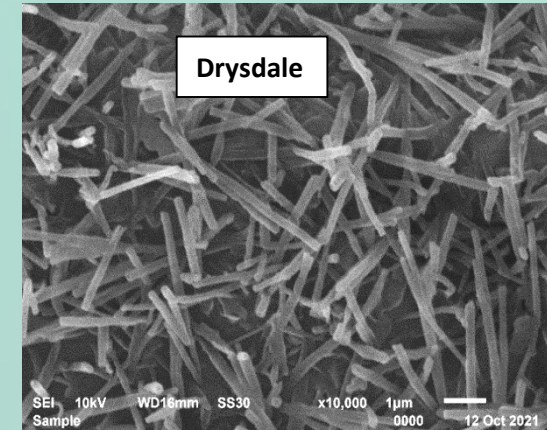
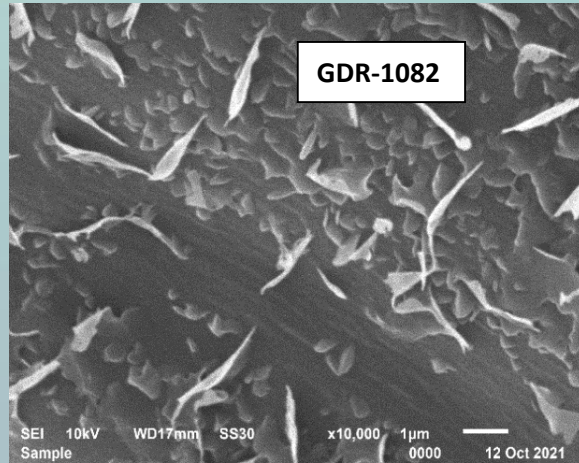
Rezultate fază III

a. Microscopia electronică cu baleiaj (SEM)- Tipuri de cristale de ceară observate în acest studiu
-partea adaxială a frunzei



Rezultate fază III

a. Microscopia electronică cu baleiaj (SEM)- Tipuri de cristale de ceară observate în acest studiu
-partea abaxială a frunzei

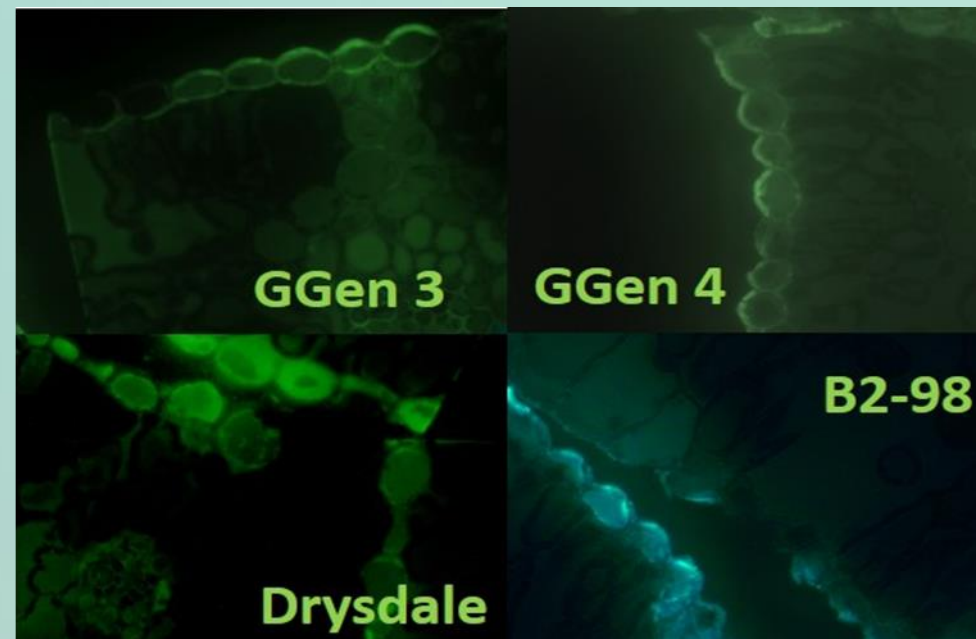


Rezultate fază III

b. Evidențierea cuticulei adaxiale și abaxiale prin analize de microscopie optică și electronică cu transmisie (TEM)

- Microscopie optică

Cuticula este observată ca un strat continuu mai evident pe partea externă a celulelor epidermice adaxiale în cazul genotipurilor GGen 4, F628, Izvor și A2-72. La variantele GGen 3, A1-3, B1-16 și A2-72 se observă un strat fluorescent în jurul celulelor epidermice, fiind evidențiată și partea internă a acestora. La Drysdale, B2-98 și A1-20 se observă o captare a colorantului auramină O nu numai la suprafața celulelor epidermice astfel încât întregul strat epidermic este fluorescent

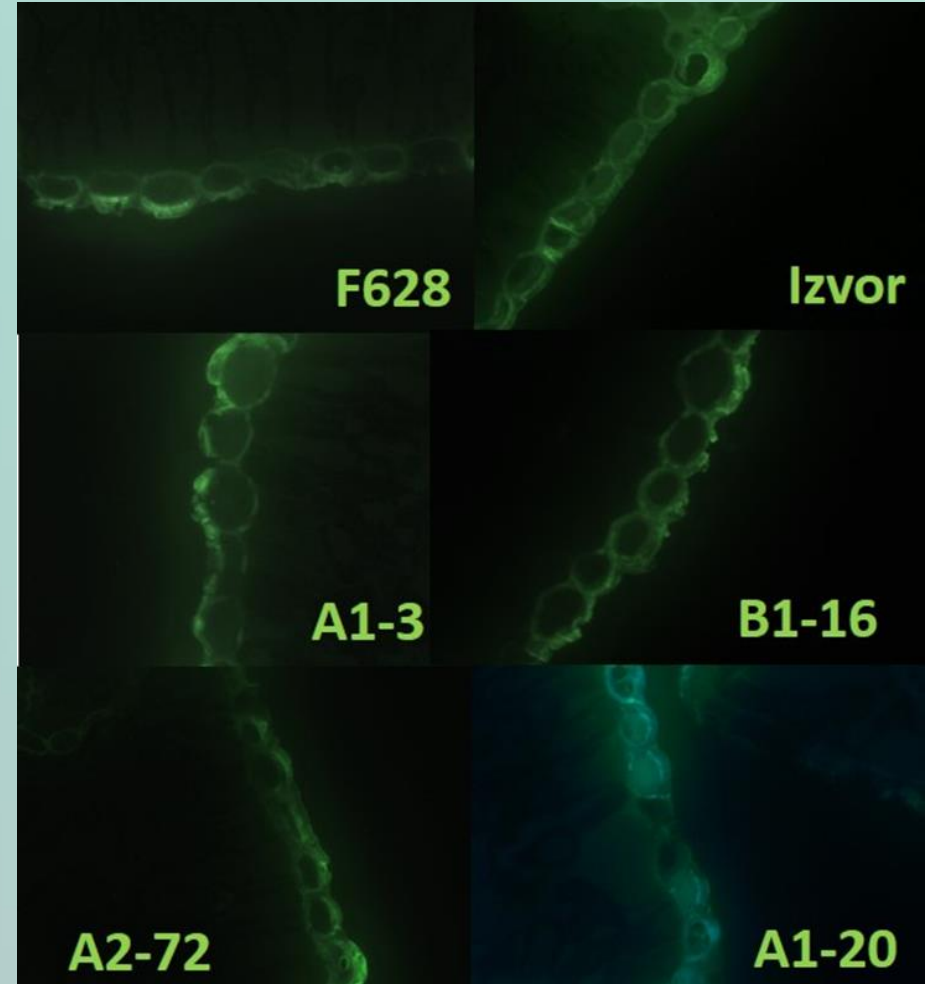
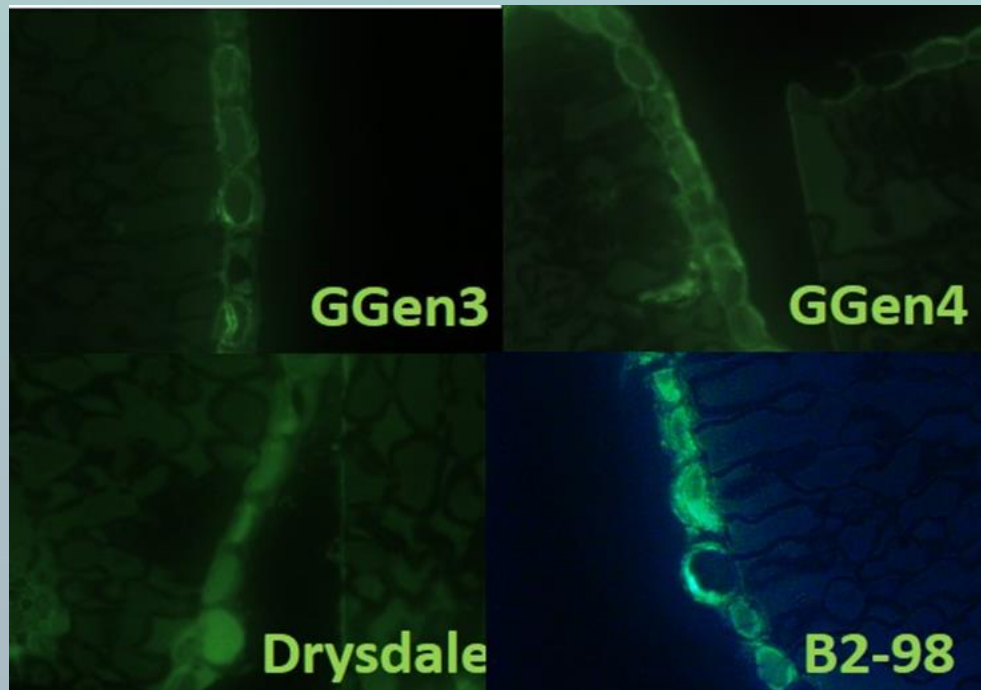


Evidențierea cuticulei adaxiale la diferite variante de grâu în microscopie optică cu fluorescență după colorația cu auramină O. Mărire 630X

Rezultate fază III

b. Evidențierea cuticulei adaxiale și abaxiale prin analize de microscopie optică și electronică cu transmisie (TEM)

- Microscopie optică



Evidențierea cuticulei abaxiale la diferite variante de grâu în microscopie optică cu fluorescență după colorația cu auramină O. Mărire 630X

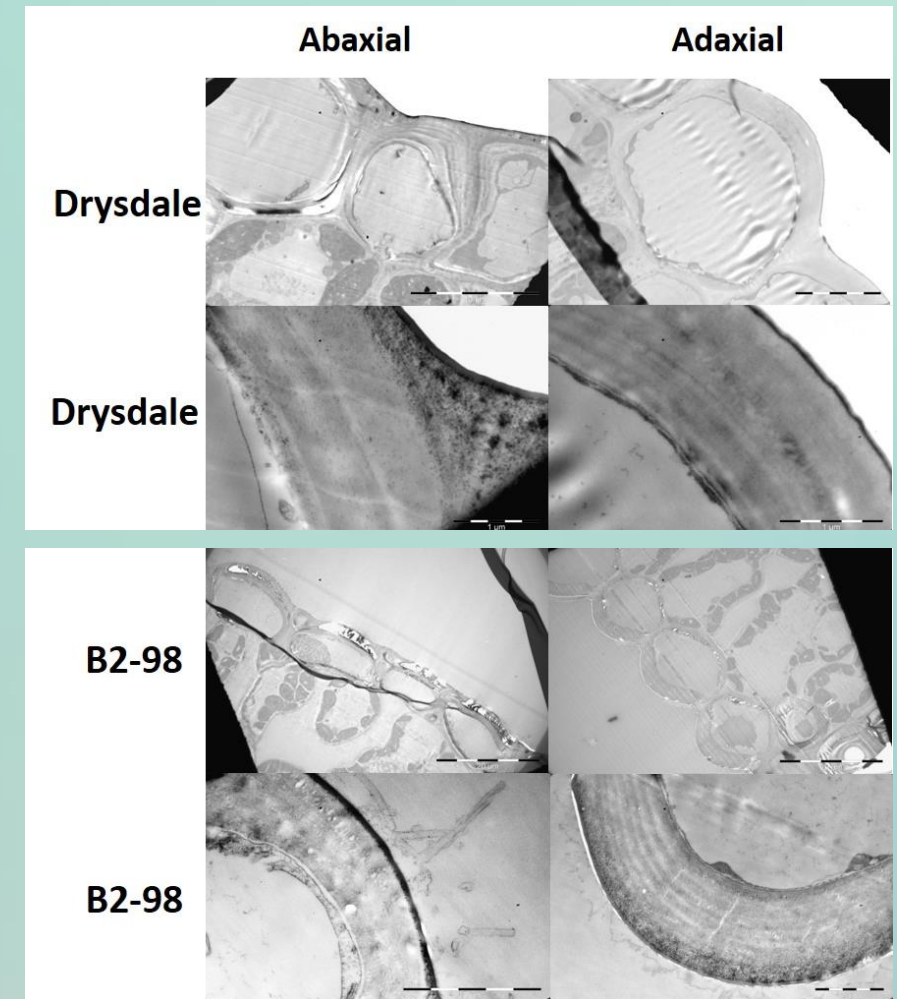
Rezultate fază III

b. Evidențierea cuticulei adaxiale și abaxiale prin analize de microscopie optică și electronică cu transmisie (TEM)

- Microscopie electronică cu transmisie-TEM

Analizele TEM ale stratului epidermic abaxial și adaxial au arătat îngroșări neuniforme ale pereților celulari externi, depinzând de tipurile celulare vizualizate. În general îngroșările pereților celulari ale celulelor epidermice de pe fata abaxială sunt mai mari la toate soiurile/liniile analizate, dar sunt și excepții, cum este cazul variantelor B2-98 și A1-72 unde pereții celulari sunt mai groși pe fața adaxială (B2-98 - 3,33 μm adaxial față de 2,72 μm abaxial, A1-72 - 3,84 μm față de 3,33 μm).

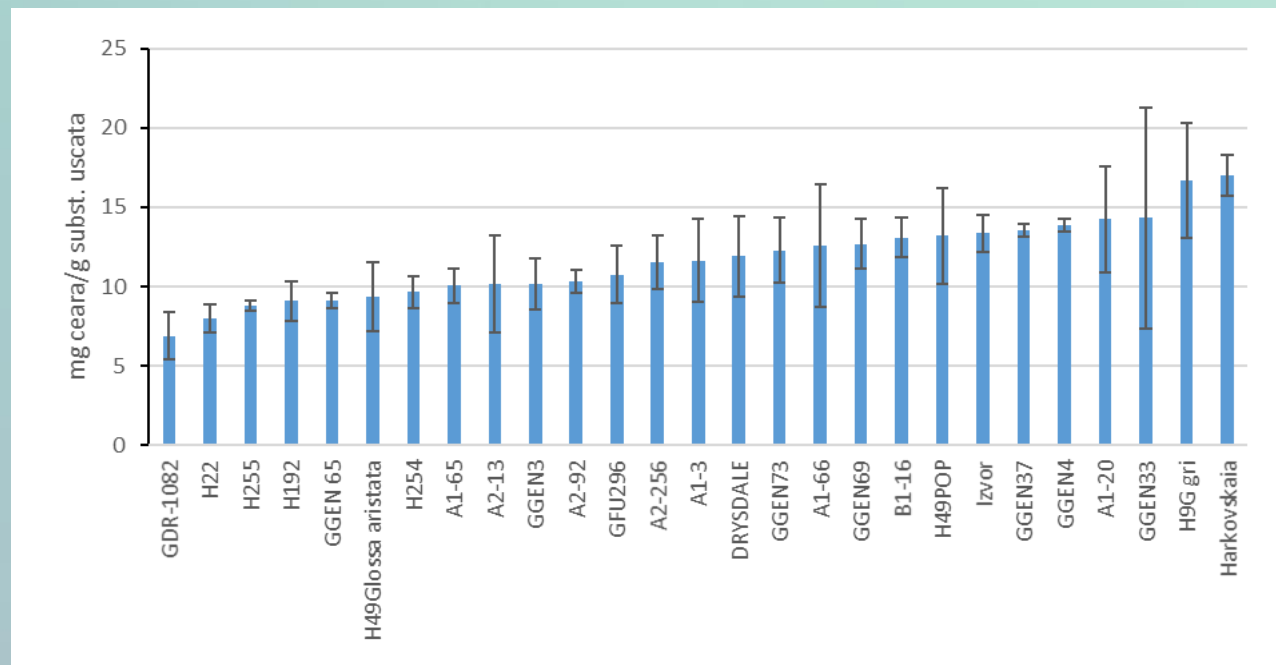
Cei mai groși pereți celulari pe partea abaxială de aproximativ 3,58 μm au fost observați la soiul Drysdale care este și rezistent la secetă, urmat de linia A1-3 cu 3,57 μm și B1-16 cu 3,52 μm .



Aspecte ultrastructurale ale pereților celulari cu modificări secundare

c. Determinarea gravimetrică a cantității de ceară epicuticulară

Genotipul cu cea mai puțină ceară a fost GDR-1082, care are un conținut de ceară epicuticulară semnificativ mai scăzut decât toate celelalte probe. Conținutul cel mai mare a fost înregistrat la linia H9G, care a fost întrecut doar de soiul de secară Harkovskaia. Conținut ridicat de ceară epicuticulară au mai prezentat A1-20, GGen 4, Izvor și B1-16, deși ultimele două nu diferă semnificativ față de celelalte soiuri de grâu



Cantitatea de ceară epicuticulară la 26 soiuri de grâu și secara Harkovskaia

- Din cele 70 de genotipuri analizate cu metoda KASP, pentru evidențierea alelelor genei *1-FEH w3*, 26 au prezentat haplotipul de tip K (37%), 40 au prezentat haplotipul W (57%) și 4 linii au prezentat haplotipuri posibil diferite (6%).
- Analiza părții abaxiale a permis o diferențiere mai clară între genotipurile cu aspect cerat, albastru-verzui (“glaucous”) al frunzelor față de genotipul GDR-1082, care are aspect lucios (“glossy”).
- Prin analiza secțiunilor semifine colorate cu auramină *O* s-a observat o cuticularizare pronunțată a celulelor epidermice la liniile **DH A1-20** și **DH B2-98** similară soiului rezistent Drysdale, aceasta indicând o potențială rezistență crescută la diferite tipuri de stresuri.
- Analiza secțiunilor semifine arată faptul că genotipurile Drysdale, B2-98 și A1-20 prezintă stratul cuticular propriu-zis cel mai bine reprezentat.
- Între genotipurile GGen3 și GGen4 nu sunt evidențiate microscopic diferențe semnificative, deși determinarea cantității de ceară epicuticulară arată că GGen4 posedă o cantitate net crescută față de GGen3. De asemenea linia **GGen 4 posedă o cantitate de ceară epicuticulară chiar mai mare decât soiul Drysdale care este rezistent la secetă.**
- Analiza secțiunilor semifine a permis evidențierea celulelor buliforme, denumite și “celule-motor” și sunt implicate în mișcările frunzei, contribuind la înfășurarea acestora în condiții adverse, iar la linia DH B2-98 celulele buliforme au dimensiuni mai mari decât la celelalte variante, ceea ce îi poate conferi o rezistență sporită la secetă. Dintre genotipurile analizate, cu privire la conținutul de ceară, se remarcă următoarele: **H9G** (*Triticum dicoccoides/Aegilops ventricosa*/ /607-3), **DH A1-20** și **GGEN4**.
- Au fost realizate noi hibridări cu specii înrudite cu grâul, pentru obținere de amfiploizi sintetici.

Activitățile și obiectivele prevăzute în cadrul fazei a III-a proiectului s-au efectuat conform planului de realizare propus.

PERSPECTIVE

- Dezvoltarea testelor KASP cu markeri funcționali la grâu;
- Continuarea analizelor pentru regiunile genomice ce codifică pentru gene analoage de rezistență la stresul biotic și posibila identificare a unor noi gene de rezistență la boli și pentru regiunile implicate în sinteza/inhibarea cerurilor epicuticulare;
- Analiza compoziției cerurilor epicuticulare;
- Identificarea unor materiale biologice valoroase pentru programele de ameliorarea grâului și obținerea de noi soiuri performante și competitive.