

PN 23.18.01.01 - *“Abordări moleculare, citogenetice și fiziologice pentru adaptarea cerealelor la schimbări climatice”*

Responsabil proiect: *Conțescu Elena-Laura*



Anul 2023

Faza 1 - “Speciile sălbatice și calea de obținere a unor rădăcini rizomatoase la grâu”

Obiectivele fazei:

- Îmbunătățirea colecțiilor de resurse vegetale cu noi varietăți de specii sălbatice, inclusiv cu specii noi;
- Stabilirea metodelor optime de selecție indirectă a genotipurilor de grâu.

Rezultate

Conceperea unei metode pentru a transfera potențialul ridicat de captare a carbonului (C) din sol în rizomi, de la rudele perene ale grâului, precum specii din genul *Leymus* și *Thinopyrum*, în soiurile moderne de grâu, pentru a contribui la atenuarea schimbărilor climatice.

Premisa obținerii unor rezultate pentru captarea carbonului este considerată sursă benefică pentru portofoliul global de atenuare a schimbărilor climatice, cu contribuții majore la reducerea degradării solului, reducerea impactului negativ asupra calității apei, reducerea utilizării pesticidelor agricole și demonstrează impactul pozitiv major asupra mediului.

S-au identificat în flora spontană plante de *Leymus* sp. cu rizomi și s-au realizat hibridări. La aceste plante s-a realizat analiză citologică a cromozomilor s-a realizat prin metoda Feulgen. Rezultatele au evidențiat prezența a 84 cromozomi. Schemele de hibridare utilizate au fost: *Elymus* sp. (spice castrate) x polen de la soiuri de grâu moderne; spice castrate de la soiul Otilia x polen de la *Elymus* sp.

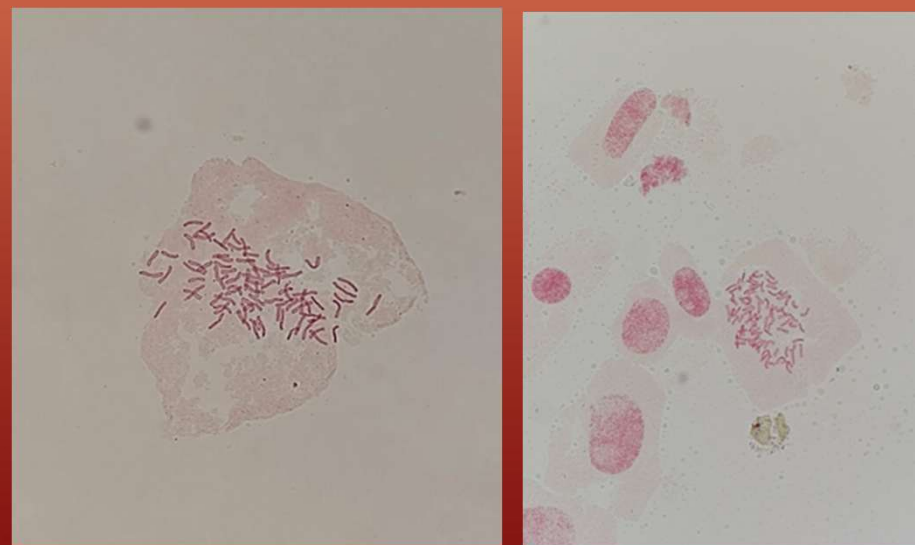


Figura 1 - Analiză citologică la *Elymus* sp.

Rezultate

În continuare se va urmări formarea cariopselor și trecerea lor pe mediu de cultură. De asemenea, speciile de *Elymus*, *Thinopyrum* și *Leymus* achiziționate de la bănci de gene se vor cultiva și vor fi caracterizate cu privire la prezența rizomilor ca ulterior să fie utilizate în hibridări cu soiuri de grâu. Un obstacol în realizarea acestor hibridări îl reprezintă decalajul perioadei de înflorire la *Elymus* sp. și soiurile de grâu.



Fig. 2 - Hibridări *Elymus* sp. x *Triticum aestivum*

An aerial photograph showing a red tractor in a field, with a portion of an orange structure visible in the lower left. The field is brown and textured, possibly from harvested crops or dry grass. The tractor is moving towards the bottom left of the frame.

Rezultate

- Au fost identificate și colectate specii sălbatice și populații locale ce pot contribui la sporirea diversității genetice a speciilor cultivate prin introducerea unor noi caractere utile pentru adaptarea la schimbările climatice survenite în ultimii ani.
- Astfel au fost contactate numeroase bănci de gene cu scopul achiziționării și colectării de material genetic din zone cât mai diferite pedoclimatic (țări și continente diferite) cu scopul îmbunătățirii germoplasmei existente.
- Informațiile obținute prin accesarea unor platforme de date au facilitat identificarea băncilor de gene care aveau material genetic de interes pentru proiectul nostru, ulterior au fost contactate via e-mail.
- La solicitările noastre au răspuns pozitiv următoarele bănci de gene: The Nordic Genetic Resource (Suedia); National Germplasm Resources Laboratory și Wheat Genetics Resource Center Gene Bank (SUA); CIMMYT Wheat Bank și CIMMYT Maize Bank (Mexic); National Agricultural and Food Centre și Research Institute of Plant Production (Slovacia); Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (Polonia); Institute of Biosciences and BioResources (Italia); Banca de Resurse Genetice Vegetale „Mihai Cristea” (România) și The Federal Ex situ Gene Bank Gatersleben (Germania).

Rezultate

Până la finalizarea acestei faze s-au recepționat 212 genotipuri:

- 31 genotipuri de *Aegilops*: *A. columnaris*, *A. cylindrica*, *A. kotschy*, *A. lorentii*, *A. markgrafii*, *A. searsii*, *A. speltoides*, *A. tauschii*, *A. ventricosa*.
- 20 genotipuri *Avena*: *A. byzantina*, *A. falc.ata*, *A. sativa*, *A. strigosa*.
- 14 genotipuri *Elymus* : *E. borianus*, *E. caninus*, *E. dahuricus*, *E. elongatus*, *E. fedtschenkoi*, *E. kronokensis*, *E. lanceolatus*, *E. repens*, *E. tsukushiensis*.
- 32 genotipuri *Hordeum* : *H. bulbosum*, *H. distichum*, *H. hrasdanicum*, *H. marinum*, *H. spontaneum*, *H. vulgare*



Fig. 3 - varietăți *Hordeum spontaneum*



Fig. 4 - *Triticum timopheevii*

Rezultate

- 7 genotipuri *Leymus* : *L. angustus*, *L. arenarius*, *L. mollis*, *L. paboanus*, *L. racemosus*.
- 5 genotipuri *Thinopyrum*: *T. bessarabicum*, *T. intermedium*
- 76 genotipuri *Triticum*: *T. aestivum*, *T. araraticum*, *T. boeoticum*, *T. dicoccoides*, *T. monococcum*, *T. spelta*, *T. timopheevii*, *T. turgidum*, *Tr. subsp. urartu*.
- 27 genotipuri *Zea mays* (Teosinte) subsp. *mexicana*.

O parte din aceste genotipuri au fost semănate în câmpul experimental al INCDA Fundulea, genotipurile receptionate după încheierea perioadei de semănat au fost cultivate în anul 2024.



Fig. 5 - Genotipuri *Zea mays* subspecia *mexicana* (Teosinte)

Rezultate

Pentru analizele privind detectarea variabilității genetice de la nivelul locusului TaBAS (gena *TaBAS1*, este implicată în toleranța la factori de stres abiotici, prezentând 2 variante alelice B1a - favorabilă și B1b) prezentă în specii sălbatice înrudite cu grâul *au fost utilizați* markeri PCR cu localizare pe cromozomul 2A (IWGSC_ref_V2.1-Chr2A:515270479-515270910 și 2D IWGSC_ref_V2.1-Chr2D:379676933-379677368). În urma amplificărilor ADN și a migrării electroforetice a produșilor PCR s-a observat polimorfism în cazul combinațiilor de primeri F1/R1 și F2/R1 pentru locusul de pe cromozomul 2A și combinația de primeri F1/R4 pentru locusul de pe cromozomul 2D.

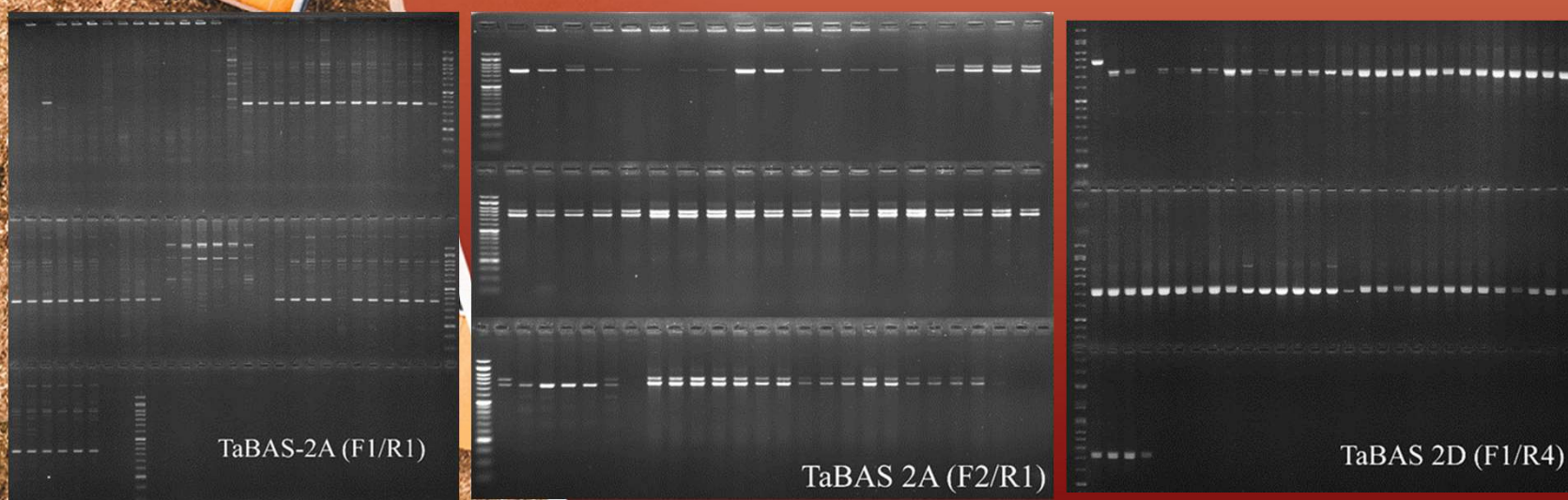


Figura 6 - Profilele electroforetice obținute în urma amplificărilor efectuate cu primerii F1/R1, F2/R1 (2A) și F1/R4 (2D)

Rezultate

În cazul cromozomului 2B, genotipurile au fost analizate cu 2 markeri KASP ce țintesc două SNP-uri, poziția 218 și 323. Analizele KASP pentru *TaBAS1-B1* (2B) au evidențiat prezența haplotipului favorabil B1a în genotipul *Aegilops speltoides* 22-2, unele genotipuri de *Triticum timopheevii* și în *Elymus sp.*

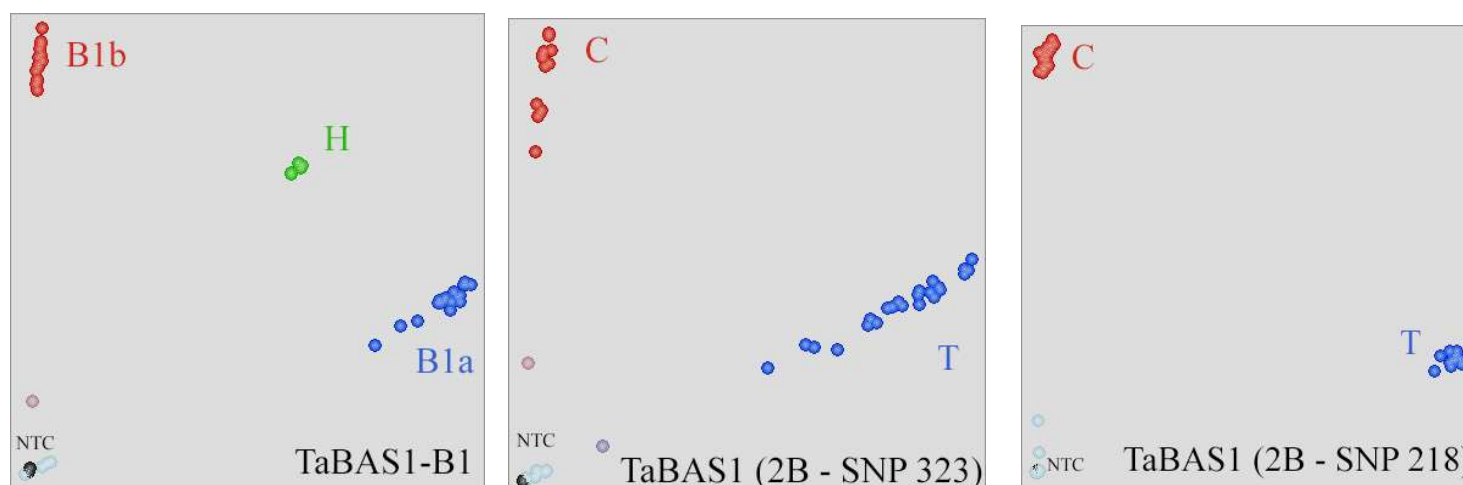


Figura 7 - Analize KASP pentru *TaBAS1-B1* (2B)



Anul 2023

Faza 2 - “Gradul de poliploidie la varietățile de *Hordeum bulbosum* din colecția institutului”

Obiectivele fazei:

- Analize citologice pentru stabilirea cariotipului varietăților de *H. bulbosum* din colecția institutului;
- Îmbunătățirea colecțiilor de resurse vegetale cu noi varietăți de specii sălbatice, inclusiv cu specii noi;
- Extinderea diversității alelice în programele de ameliorare a cerealelor.

Rezultate

- Au fost efectuate analize citologice pentru stabilirea cariotipului a 50 de varietăți de *Hordeum bulbosum* din colecția institutului. În urma analizei cariotipului la plantele de *H. bulbosum* L. au fost identificate asocieri de 7 bivalenți caracteristice citotipurilor diploide ($2n=14$) la varietățile Hb 3 și Hb 4 și asocieri de 14 bivalenți la citotipurile tetraploide ($2n=28$) din cadrul varietății Hb 4X. Analiza celulelor mame polinice efectuată în Metafaza I meiotică la genotipurile **Hb 3** a evidențiat un număr de șapte bivalenți. Analiza celulelor mame polinice efectuată în Metafaza I meiotică și Diakineză (Profaza I meiotică) la genotipurile **Hb 4** a evidențiat un număr de 7 bivalenți. Analiza celulelor mame polinice efectuată în Metafaza I meiotică la genotipurile **Hb 4X** a evidențiat o asociație de tip tetravalent.

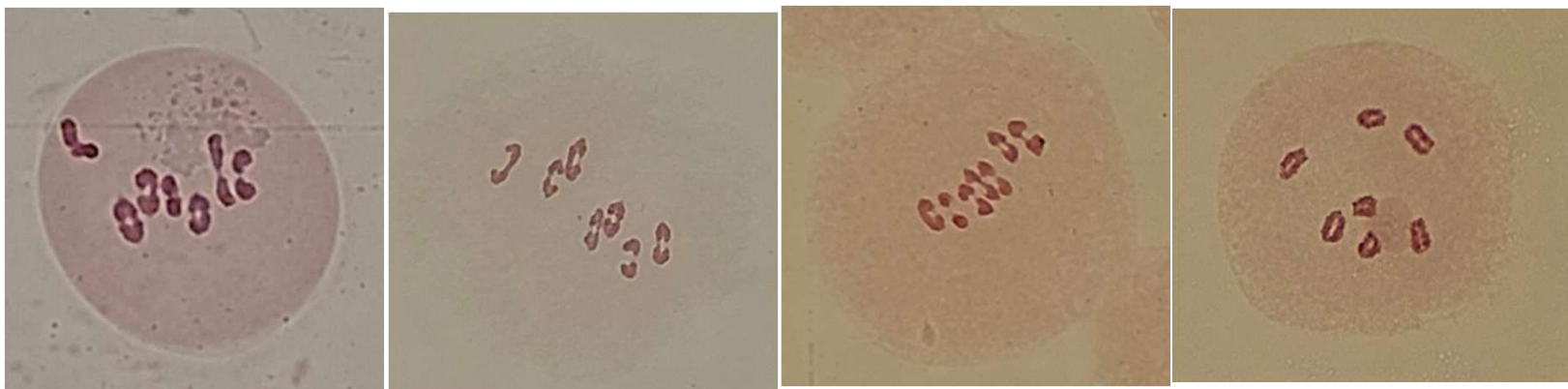


Fig. 8 - Celule mame polinice la genotipurile Hb 3-6, Hb 3-9, Hb 4-82 și Hb 4-128 (de la stânga la dreapta)

Rezultate

- Rezultatele analizelor moleculare cu markeri SCoT pentru studiul diversității genetice a varietăților de *H. bulbosum* au evidențiat polimorfismul existent printre genotipurile sălbatice și genotipurile cultivate (*H. vulgare*) de orz. Toți cei opt markeri utilizați au evidențiat rezultate pozitive, respectiv benzi clare și distincte, pentru toate genotipurile studiate. Numărul total de benzi obținute cu sistemul de markeri SCoT a fost de 79 benzi. Numărul de benzi/primer a variat între 8 și 12 benzi. Dimensiunea benzilor a variat între 400 și 3000 Pb (perechi baze).
- Analizele efectuate cu markerul **SCoT 2** au evidențiat similarități între genotipurile de *H. bulbosum* și cele de *H. vulgare*, respectiv 2 benzi monomorfe de 800 și 1000 Pb comune tuturor genotipurilor analizate. Au fost identificate și 2 benzi unice cu dimensiunea de 650 și 850 Pb la genotipurile tetraploide. Produși unici cu dimensiunea de 1400 Pb au fost evidențiați doar în cazul genotipurilor de *H. vulgare*.

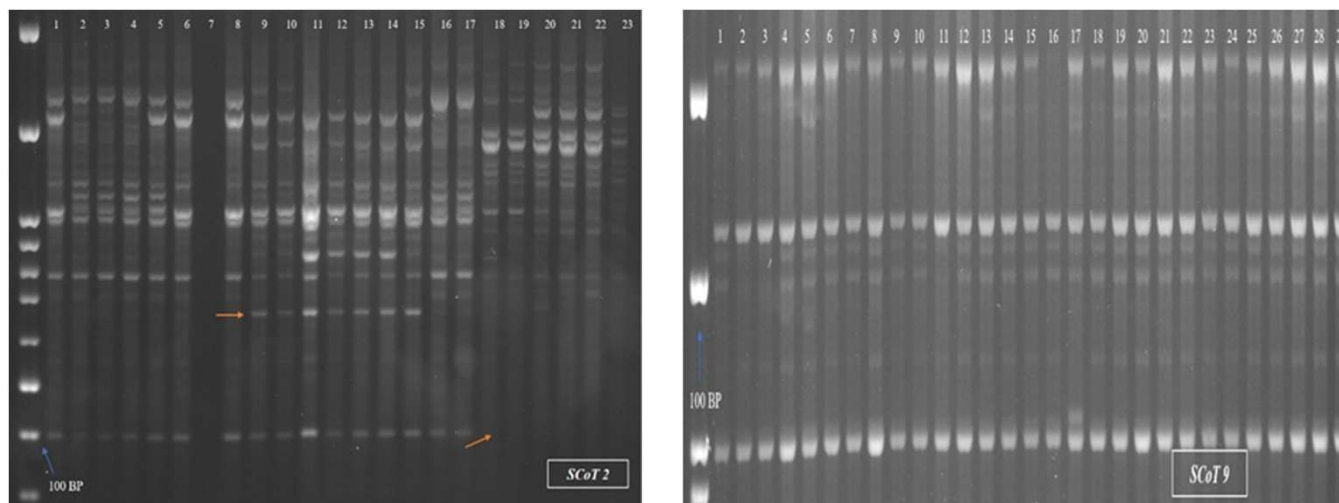


Fig. 9 - Profile electroforetice obținute cu markerii SCoT 2 (st) și SCoT 9 (dr)

Rezultate

- Analizele cu markerul **SCoT 9** au evidențiat un produs monomorfic >3000 Pb la toate genotipurile analizate. Produși polimorfici unici de 2900 Pb au fost identificați la genotipurile tetraploide și la 3 genotipuri diploide. Toate genotipurile cultivate de orz și orzoaică au prezentat produși polimorfici de 750, 1200, 2000 și 3000 Pb.
- Analiza cu markerul **SCoT 12** a evidențiat produși de 1050, 1070, 1250, 1300 și 2800 Pb în toate genotipurile de *H. bulbosum*, aceștia au lipsit la genotipurile de *H. vulgare*. O bandă polimorfică de 1000 Pb a fost identificată la 4 genotipuri tetraploide și la un genotip diploid.
- Analiza cu markerul **SCoT 13** evidențiat produși polimorfici de 530, 550, 680 și 1150 Pb, specifici genotipurilor cultivate de orz și orzoaică. La toate genotipurile de orz s-au identificat 3 produși monomorfici de 780, 930 și 1050 Pb.

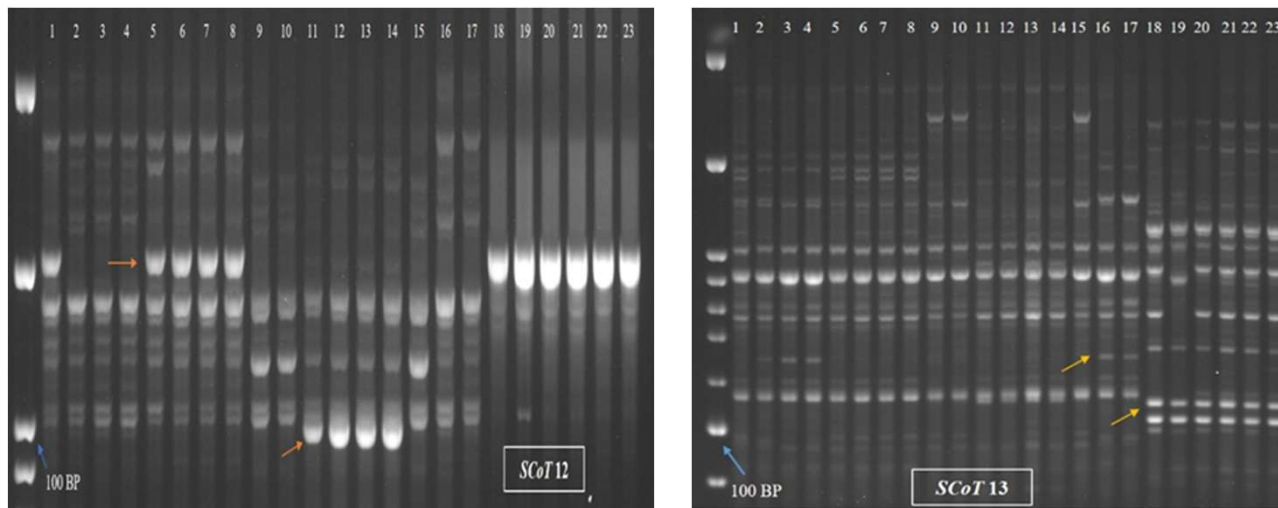


Fig. 10 - Profile electroforetice obținute cu markerii SCoT 12 (st) și SCoT 13 (dr)

Rezultate

- Analiza PCR cu markerul **SCoT 16** a evidențiat la toate genotipurile analizate 4 benzi monomorfe de 620, 750, 1100 și 1500 Pb. În cazul genotipurilor cultivate analiza PCR a evidențiat un produs polimorfic de 850 Pb.
- Analizele cu markerul **SCoT 20** au evidențiat produși polimorfici de 750 și 2500 Pb la genotipurile de *H. bulbosum*. Genotipurile tetraploide și genotipurile orz cultivat au prezentat un produs polimorfic de 1050 Pb. Tot la genotipurile tetraploide au fost identificați produși polimorfici de 520 și 550 Pb. Doi produși polimorfici de 780 și 2000 Pb au fost identificați doar la genotipurile de orz și orzoaică cultivate.
- Analizele cu markerul **SCoT 24** au 3 benzi polimorfice de 750, 1050 și 2700 Pb evidențiat la toate genotipurile de orz cultivat. Un produs polimorfic de 600 Pb a fost identificat la toate genotipurile, cu excepția celor tetraploide, care au prezentat un produs de 720 Pb. Genotipurile de *H. bulbosum* au prezentat 2 produși polimorfici de 1000 și 2250 Pb.

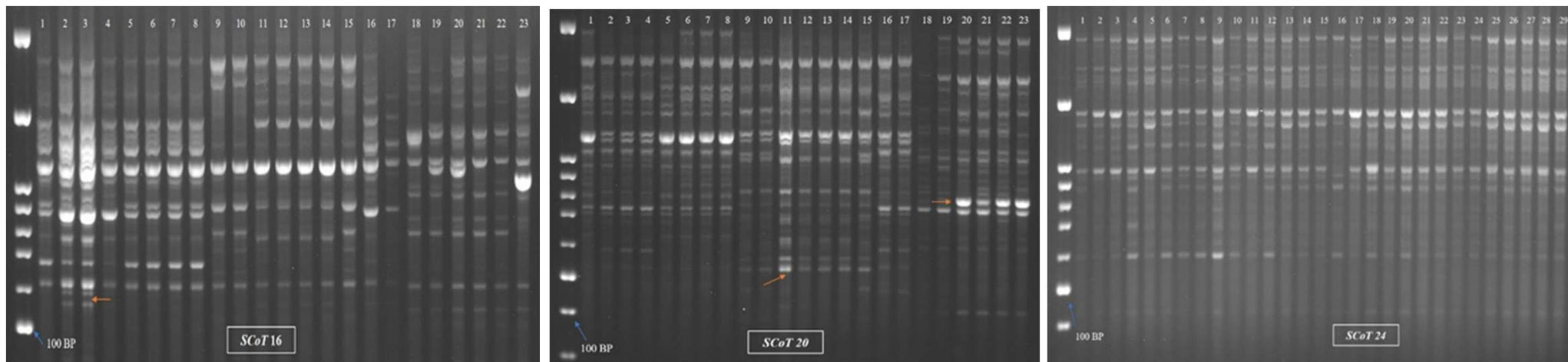
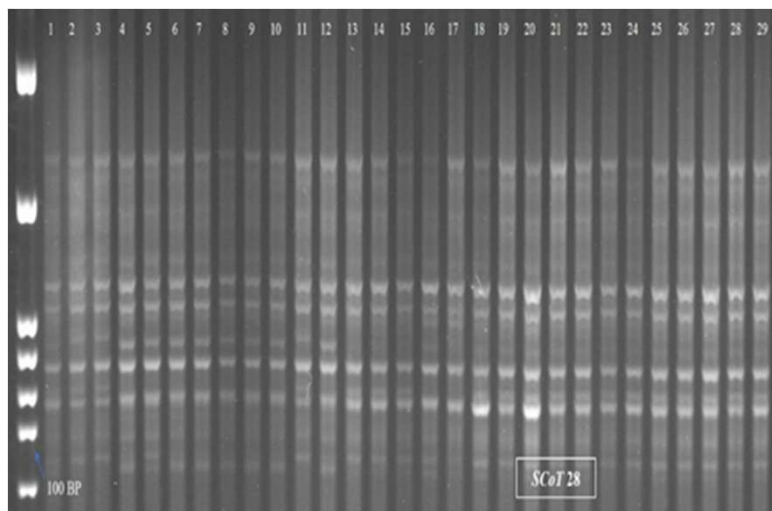


Fig. 11 - Profile electroforetice obținute cu markerii SCoT 16 (st.), SCoT 20 (centru) și SCoT 24 (dr.)

Rezultate

- Analiza cu markerul SCoT 28 a evidențiat 2 produși monomorfici cu dimensiunea de 1050 și 2000 Pb, la toate genotipurile analizate. Doi produși polimorfici de 880 și 1150 Pb a fost identificați la genotipurile *H. bulbosum* iar la genotipurile de orz cultivat 2 produși de 600 și 2500 Pb.
- Rezultatele analizelor cu cei opt markeri SCoT au evidențiat polimorfism atât între genotipurile diplode și tetraploide de orz sălbatic cât și între genotipurile sălbatice și cele cultivate, astfel, sistemul de markeri SCoT și-a dovedit eficiența în evidențierea diversității genetice a varietăților de *H. bulbosum* din colecția Institutului



- Benzile rezultate în urma analizei PCR cu cei opt markeri SCoT au fost utilizate pentru calcularea distanțelor genetice și pentru obținerea unei dendrograme. Pentru aceasta, pentru prezența unei benzi a fost notată cu “1”, respectiv cu “0” pentru absența benzii. Dendrograma a evidențiat gruparea genotipurilor analizate în două cluster principale: primul a cuprins toate genotipurile de *H. bulbosum*, având două 2 subcluster care la rândul lor s-au ramificat în funcție de similitudinile genetice. Al doilea cluster principal a cuprins toate genotipurile de *H. vulgare*, cele 2 soiuri de orzoaică fiind grupate separat într-un subcluster, al doilea subcluster cuprinzând soiurile cultivate de orz.

Fig. 12 - Profile electroforetice obținute cu markerul SCoT 28

Rezultate

- Distribuția PCA (Principal Component Analysis) a reconfirmat informațiile evidențiate cu ajutorul dendrogramei.
- Cele două axe principale au reprezentat 46,16% (CP1) și respectiv 20,09% (CP2) din variație, împreună explicând 66,25% din variabilitatea totală.

Aceste rezultate evidențiază diversitatea genetică a genotipurilor de Hordeum, analiza cu markeri SCoT asigurând o bună diferențiere a acestor genotipuri.

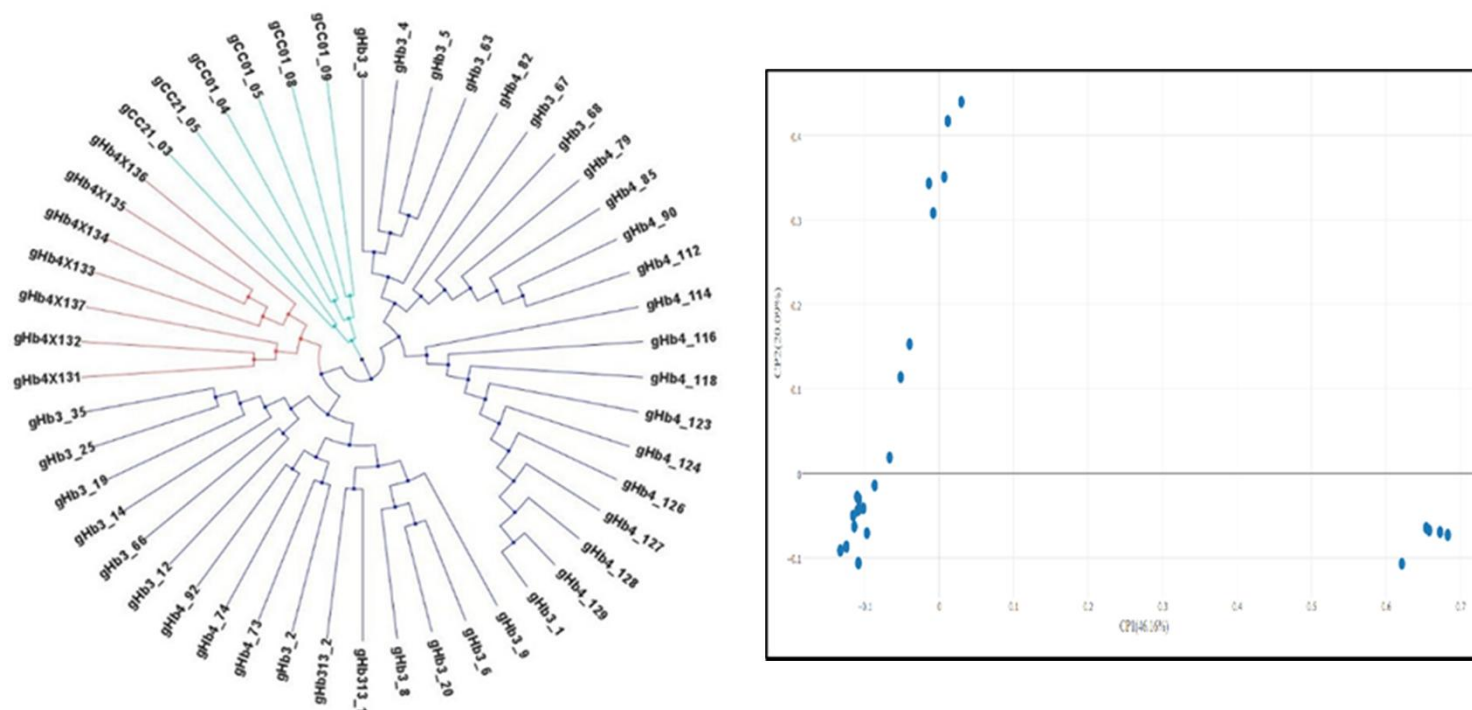


Fig. 13 - Dendrograma obținută pe baza analizei cu markeri SCoT și a distanțelor genetice (st.) și distribuția PCA (dr.)

Rezultate

Analizele **cu markeri SRAP** au evidențiat produși cu dimensiuni cuprinse între 150 și 1500 Pb. Cel mai mare număr de alele a fost obținut cu markerul SRAP 20 iar cel mai mic cu markerul SRAP 80. Analizele efectuate au evidențiat diferențe clare între formele diploide și cele tetraploide de *H. bulbosum*, cu toți cei cinci markeri SRAP utilizați, indicând că acest sistem de markeri poate fi util pentru testarea genotipurilor de *Hordeum*, în scopul evidențierii diversității genetice existente la genotipurile de orz sălbatic și cultivat.

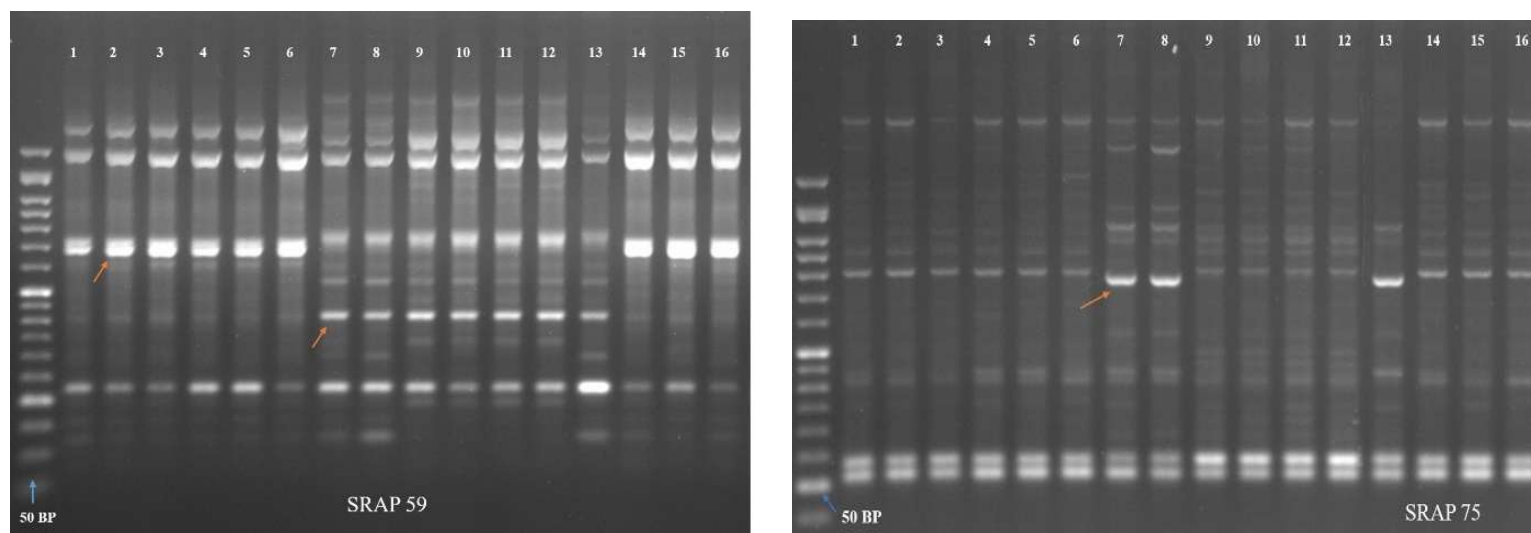


Fig. 14 - Profile electroforetice obținute cu markerii SRAP 59 și SRAP 75

Rezultate

- Au fost obținute noi rezultate în ceea ce privește solicitarea și recepționarea unor noi genotipuri sălbatice de porumb sălbatic. Genotipurile recepționate în faza anterioară au fost semănate în câmpul experimental al INCDA Fundulea.
- Tot în această fază a fost înființat un câmp experimental cu linii de grâu, la care se vor aplica diferite doze de azot, pentru aprecierea contribuției unor variante alelice ale genelor NAM asupra conținutului în proteină. Analize au fost prevăzute pentru Faza 3.



Fig. 15 - Genotipuri Zea mays subspecies mexicana în iunie (st.) și septembrie (dr.) 2023



Diseminare rezultate

- **Rezultatele obținute** pe parcursul anului 2023 au fost prezentate în cadrul Conferinței Internaționale “Biodiversitatea agrosilvică, sub impactul schimbărilor climatice - gestionarea prin ameliorare și tehnologii adecvate, garanție a siguranței și securității alimentare, în lucrarea cu titlul “*Perspectives of exploiting wild species/local landraces for cereals improvement in the context of the actual changing climate*” (Autori: E.L. Conțescu, M. Ciucă, D. Cristina, A. Dumitru, E. Partal, A. G. Turcu).

De asemenea a fost publicat un articolul “ *Utilizarea speciilor sălbatice/populațiilor locale cu scopul îmbunătățirii cerealelor cultivate în contextul actualelor schimbări climatice*”. AN. INCDA Fundulea, VOL. XCI, pag. 69-82. (Autori: E. L Conțescu, M. Ciucă, E. Partal, F. G. Anton, D. Horhocea, A. Dumitru).