

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

Responsabil proiect: ***Conțescu Elena-Laura***



Anul 2024

Faza 3 - „Detectarea variabilității genetice la locii NAM-A1, NAM-B1 și NAM-D1 din grâu și îmbunătățirea colecțiilor de specii sălbatice utile ameliorării cerealelor”

Obiectivele fazei:

- Studii privind variabilitatea genetică existentă la nivelor locilor NAM-A1, NAM-B1 și NAM-D1, cu rol în remobilizarea azotului, senescență, conținut de proteine și minerale, din speciile sălbatice înrudite cu grâul;
- Îmbunătățirea colecțiilor de resurse vegetale cu noi varietăți;
- Analize chimice la nivel de plantă.

Rezultate

Au fost efectuate analize cu **markeri KASP**, pentru detectarea variabilității genetice de la nivelul locusului NAM-A1 la soiuri, linii, populații vechi de grâu și genotipuri sălbatice. Polimorfismul evidențiat la nivelul genei *NAM-A1* se datorează identificării a două SNP-uri. Primul SNP (SNP-1) a fost identificat în domeniul NAC al genei și este determinat de inversia C/T. Acesta determină substituția aminoacidului alanină cu aminoacidul valină în secvența proteică. SNP 2 este determinat de o inserție/deleție (IN/DEL) A/del ce determină obținerea unei proteine truncate. Cele două SNP-uri determină o variabilitate genetică concretizată prin 4 haplotipuri: NAM-A1a, NAM-A1b, NAM-A1c și NAM-A1d. Analizele cu cei 2 markeri moleculari aferenți SNP-urilor 1 și 2 pentru analiza locusului Nam-A1 au evidențiat faptul că în germoplasma de grâu predomina alela T pentru SNP-1 și alela A la SNP-2, rezultând 3 haplotipuri, respectiv, *NAM-A1a*, *NAM-A1c* și *NAM-A1d* dar și materiale heterozigote. Analiza speciilor sălbatice a evidențiat predominanța alelei C pentru SNP-1 și alela A la SNP-2, rezultând 2 haplotipuri, respectiv, NAM-A1a și NAM-A1c.

Un alt rezultat a vizat detectarea variabilității genetice de la nivelul **locusului *NAM-B1*** ce prezintă 3 haplotipuri: tipul sălbatic funcțional, mutant și varianta de deleție a genei. Doar alela *NAM-B1* de tip sălbatic păstrează funcția normală a genei fiind asociată cu conținutul ridicat de proteine. Pentru aceste analize s-a utilizat tehnica KASP, respectiv markerul GCP_DUP. Acesta evidențiază o deleție de 4 Pb legată de gena *Gpc-B1* de la *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* și este absent în majoritatea liniilor comune și de grâu durum. Rezultatele obținute au evidențiat prezența alelei de tip “gpc -”, la 100 din cele 102 genotipuri analizate, alela fiind asociată conținutului normal în proteine.

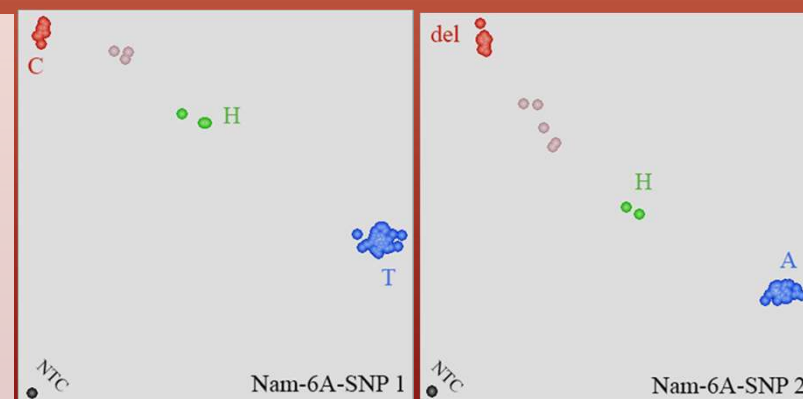


Fig. 1 - Rezultatele analizei KASP pentru locusul NAM-A1



Rezultate

Analiza celor 44 de specii sălbatice a evidențiat prezența alelei “gpc -”, asociată conținutului normal în proteine la cincisprezece dintre genotipurile analizate. Un singur genotip a prezentat alela “GPC+”, asociată conținutului ridicat în proteine. Genotipurile ce nu au prezentat amplificare pentru acest marker, fiind vorba de specii sălbatice, cel mai probabil nu prezintă locusul respectiv.

- În ceea ce privește detectarea variabilității genetice de la nivelul locusului *NAM-D1*, nu au fost evidențiate variații alelice cu markerul KASP 2316b-6D#15 pentru cele 102 genotipuri analizate, toate având varianta alelică „G” - Paragon (HEX). În cazul celor 44 de specii sălbatice analizele au permis evidențierea unor diferențe între genotipuri: 14 au prezentat varianta G1, 11 varianta G2, 16 varianta G3 și 2 varianta G4.

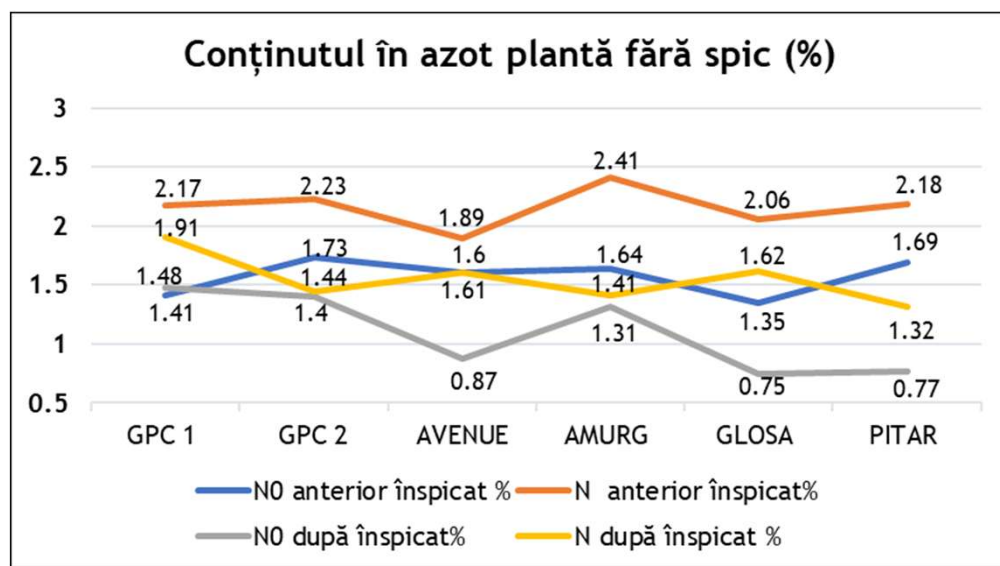
- De asemenea au fost efectuate observații fenotipice în ceea ce privește data înspicului, talia și bioma plantelor, cu aparatul portabil GreenSeeker, sub forma de NDVI. NDVI este legat de vegetație, deoarece plantele verzi sănătoase absorb cea mai mare parte a luminii roșii și reflectă lumina infraroșie. Puterea luminii detectate este un indicator direct al stării de sănătate a culturii.

- Pentru analizele chimice privind conținutul în N și C în sol au fost prelevate șase genotipuri de grâu din câmpul de Ameliorare a cerealelor (INCDA Fundulea). Prima prelevare s-a efectuat înainte de data înspicului, a doua prelevare după înspicat iar ultima prelevare la maturitatea fiziologică. Pentru calcularea conținutului în N al plantelor prelevate înainte de înspicat s-a folosit planta întreagă, pentru al plantelor prelevate după înspicat s-a efectuat analiza spicului și analiza plantei.

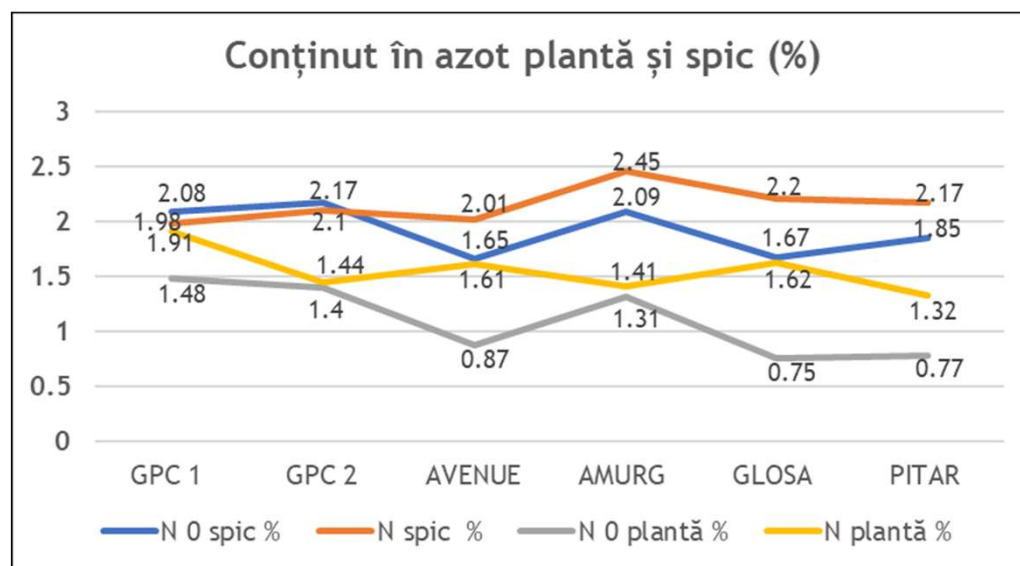
Rezultate

- Analizând comparativ, conținutul în N al genotipurilor prelevate înainte și după înspicat putem concluziona că valorile cele mai ridicate au fost obținute la genotipurile fertilizate prelevate înainte de înspicat, valorile mai reduse obținute de genotipurile fertilizate prelevate după înspicat, demonstrează că o mare parte din acest N a fost mobilizat către spic. La ambele variante nefertilizate, se observă valori mai reduse față de variantele fertilizate.

- Analizând conținutul în N al genotipurilor prelevate după înspicat putem concluziona valorile conținutul de N din spic au fost superioare conținutului de N din plantă, atât la varianta fertilizată cât și la varianta nefertilizată. Cele mai ridicate valori, la ambele variante, au fost identificate la soiul Amurg, sugerând o bună translocare a N către spic



Grafic 1 - Conținutul în azot al genotipurilor prelevate înainte și după înspicat



Grafic 2 - Conținutul în azot (planta și spic) al genotipurilor prelevate după înspicat



Rezultate

- A fost continuată activitatea de colectare de specii sălbatice înrudite cu porumbul, fiind solicitate și recepționate până în prezent un număr de 13 genotipuri de *Aegilops* sp., 100 genotipuri *Secale* sp., 7 genotipuri *Triticosecale* sp., 2 genotipuri *Triticum* sp. și 88 genotipuri *Zea* sp.
- Genotipurile recepționate în anul 2023 au fost deja semănate în câmpul experimental, cele recepționate în anul curent urmând să fie semănate în epoca optimă specifică fiecărei culturi. Numărul de variante va fi corelat cu cantitatea de material recepționată de la băncile de gene (25-50 boabe pentru majoritatea genotipurilor).



Anul 2024

Faza 4 - „Detectarea variabilității fiziologice și genetice în linii moderne și populații vechi de porumb la nivelul unor loci cu rol în toleranță la stres hidric”

Obiectivele fazei:

- Analize fiziologice la nivel de plantulă pentru rezistența la factori abiotici în condiții determinate (de laborator) prin determinări privind stabilitatea membranei celulare, transpirația cuticulară și conductanța stomatică, determinări de creștere (măsurători asupra lungimii rădăcinii embrionare primare și determinări privind conținutul de clorofilă al frunzelor de porumb în condiții de câmp;
- Analize cu markeri moleculari privind variabilitatea genetică existentă în germoplasma de porumb formată din linii moderne și populații vechi de porumb;
- Măsurători privind elementele de producție: greutatea știuletelui, numărul de boabe pe știulete și greutatea boabelor din știulete.

Rezultate

Analizele fiziologice la plantulă au avut ca scop evaluarea rezistenței la factori abiotici în condiții determinate și au fost efectuate cu ajutorul testului PEG. Metoda este utilizată pentru a simula stresul hidric prin crearea unui mediu osmotic care imită condițiile de apă limitată din sol.

Cu același scop, au fost efectuate măsurători de creștere, în special lungimea rădăcinii primare cu ajutorul softului ImageJ. Acestea sunt deosebit de importante deoarece rădăcinile sunt esențiale pentru absorbția apei, iar în condiții de secetă, unele plante își modifică arhitectura rădăcinilor pentru a accesa mai bine sursele de apă. Astfel, prin compararea lungimii rădăcinilor în condiții de stres și în condiții normale, se poate evalua capacitatea de adaptare a plantelor și toleranța lor la stresul hidric, respectiv, creșterea mai mare a rădăcinii în condiții de stres sugerează o toleranță mai mare la secetă, deoarece planta poate accesa rezerve de apă din straturi mai adânci ale solului.

Stresul hidric a avut un efect negativ asupra **înălțimii** genotipurilor de porumb studiate. La plantele crescute în condiții optime, a variat între 353 - 108 mm, în timp ce la plantele supuse stresului hidric aceasta a variat între 283 - 101 mm. În medie, talia plantelor a fost cu 29 mm mai redusă în condiții de stres hidric.

Cel de-al doilea caracter studiat, **lungimea rădăcinii principale**, a fost influențat semnificativ de stresul hidric dar și genotip. Plantele crescute în condiții optime, au avut rădăcini cu lungimi care au variat între 521-181 mm, în timp ce la plantele supuse stresului hidric aceasta a variat între 362-168 mm. În medie, rădăcina plantelor a fost cu 56 mm mai redusă în condiții de stres hidric.

Rezultate

În ceea ce privește **suprafața foliară**, în cazul plantelor crescute în condiții optime, aceasta a variat între 372-239 mm², în timp ce la plantele supuse stresului hidric aceasta a variat între 2146 -177 mm². În medie, suprafața foliară a fost cu 548 mm² mai redusă în condiții de stres hidric. În scopul calculării indicelui pentru toleranța la secetă s-au făcut și următoarele determinări: substanță proaspătă tulpină, substanță uscată tulpină, substanță proaspătă rădăcină, substanță uscată rădăcină, conținutul în clorofilă și volumul rădăcinii.

Analizând valorile obținute pentru **conținutul de clorofilă**, se poate observa că, în cazul genotipurilor cărora li s-au asigurat condiții optime, valorile au variat între 35,4 (linia P 23-23) și 20,7 (linia P 53-23). Pentru genotipurile cultivate în condiții de stres, valorile au avariat între 35,4 (P 28-23) și 12,2 (P 33-23).

Toate aceste valori au fost utilizate pentru a obține informații referitoare la toleranța la secetă a genotipurilor de porumb în fază de plantulă, mai precis pentru a calcula indicele pentru toleranța la secetă (IndSec). Genotipurile cu valorile cele mai mici ale acestor indici vor fi promovate în procesul de selecție artificială, comportamentul acestora în condiții controlate fiind corelat cu performanțele în câmp.



Fig. 2 - Plănuțe de porumb la începutul și finalul experimentului (st.-cond. optime, dr.-stres hidric)

Au fost optimizate metode și analize cu markeri moleculari pentru detectarea variabilității genetice existente în germoplasma de porumb. Analizele cu markeri **SCoT** au avut ca scop identificarea polimorfismului dintre genotipurile noi și populațiile vechi. Trei markeri au evidențiat benzi clare și distincte, pentru toate genotipurile studiate.

Analiza cu markerul **SCoT 13** a evidențiat similarități între toate genotipurile de porumb analizate, respectiv produși cu dimensiunea de 650 pb și 950 Pb. Un produs de 750 Pb a fost identificat la majoritatea liniilor noi de porumb și la 3 genotipuri sălbatice. La genotipurile de porumb sălbatic s-au evidențiat produși de 480, 520, 600 și 800 Pb.

Analiza cu markerul **SCoT 24** a evidențiat la aproape toate genotipurile analizate benzi polimorfice de 700, 1400 și 1600 Pb dar și 2 benzi monomorfe de 750 și 1000 Pb, în tot materialul analizat.

Markerul **SCoT 12** a fost utilizat pentru analiza a 56 de linii noi de porumb, rezultatele obținute au evidențiat doi produși polimorfici de 1250 și 1400 Pb, la aproximativ jumătate din materialul analizat. De asemenea s-a identificat un produs monomorfic, de 2400 Pb la toate genotipurile analizate.

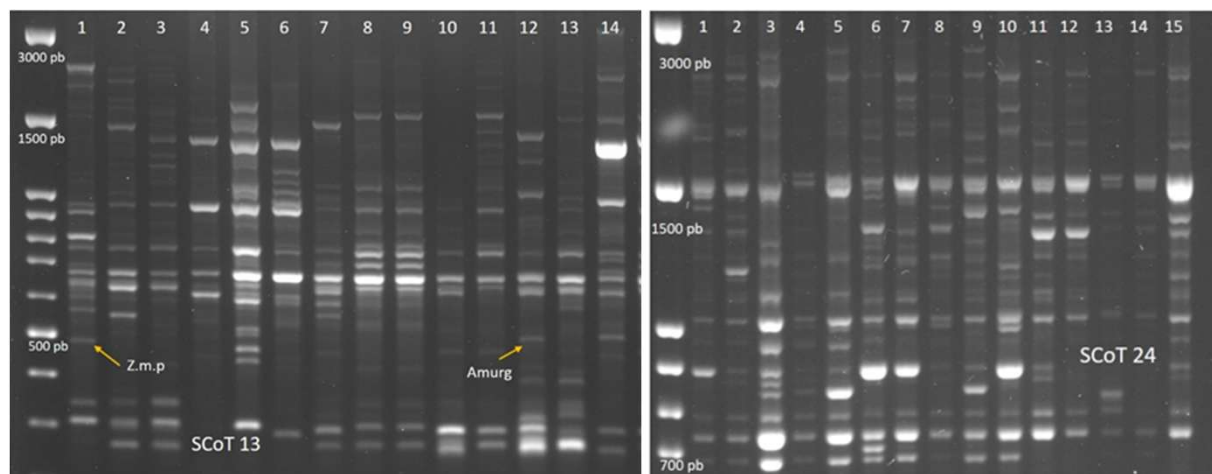


Fig. 3 - Profile electroforetice obținute cu markerii SCoT 13 (st) și SCoT 24 (dr)

Analizele cu markeri SSR au urmărit identificarea polimorfismului existent la nivelul liniilor noi de porumb în ceea ce privește toleranța la stresul hidric. Analiza PCR cu markerul **phi 072** a evidențiat produși cu dimensiuni cuprinse între 145 - 170 pb. Genotipurile cu cel mai bun indice de rezistență la stresul hidric au avut produși cu dimensiunea de 155-170 pb. Genotipurile cu cel mai slab indice de rezistență la stres au avut produși cu dimensiunea de 145 pb.

Analizele cu markerul **phi 053** au evidențiat produși cu dimensiuni cuprinse între 160-1500 pb. Majoritatea liniilor analizate au prezentat profilul: 160, 200, 400 și 1500 pb. Liniile care au avut cel mai bun indice de rezistență la secetă au prezentat toți cei 4 produși, în timp ce liniile cu cel mai prost indice nu au prezentat produsul de 160 pb. Studii anterioare (Maheswari, 2016) au identificat o asocieră între acest marker și toleranța la stresul hidric, de asemenea a fost asociat cu înălțimea plantei și cu lungimea intervalului înflorit - mătăsit (Guo, 2008).

Analizele cu markerul **umc 1506** au evidențiat produși cu dimensiuni cuprinse între 120-130 pb. Majoritatea liniilor analizate au prezentat un produs de 120 pb sau de 130 pb, însă au fost și genotipuri care le-au prezentat pe ambele. Liniile care au prezentat un indice ridicat de rezistență la secetă au evidențiat un produs de 120 pb, iar liniile care au prezentat un indice mai scăzut de rezistență au prezentat produsul de 130 pb.

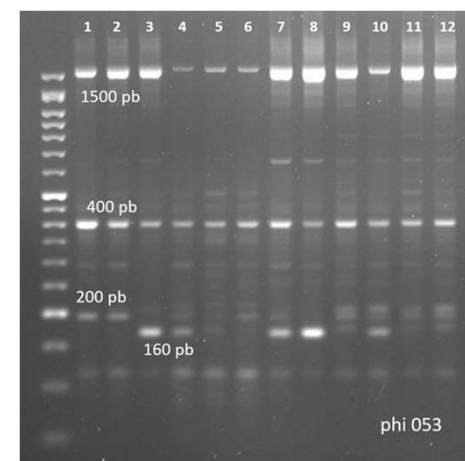
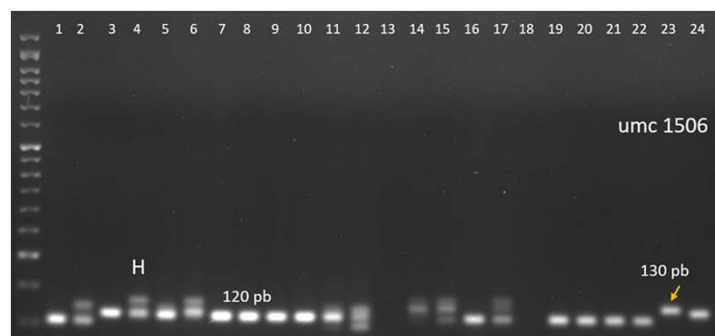
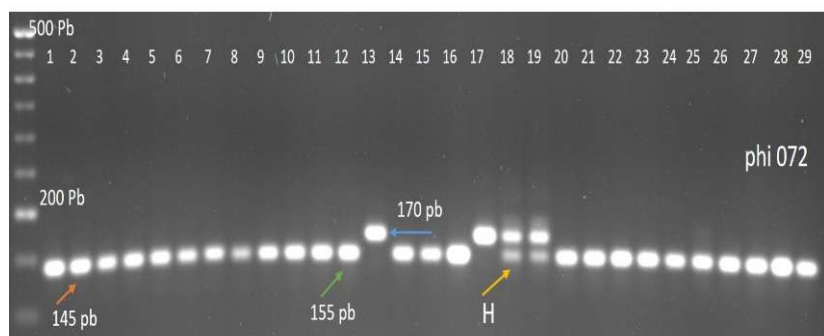


Fig. 4 - Profile electroforetice cu markerii phi 072, umc 1506 și phi 053

Pentru studiul genotipurilor de porumb au fost utilizați și 3 markeri KASP: ZmCRR8, GRZM5G812926 și GRZM2G85041. Genele identificate cu acești markeri reprezintă potențiali candidați pentru îmbunătățirea genetică a porumbului, având aplicații în optimizarea arhitecturii radiculare și creșterea eficienței utilizării resurselor. Din păcate, rezultatele obținute, pentru genotipurile noastre, nu au permis gruparea clară a clusterelor după SNP-urile analizate, fiind necesară identificarea și testarea altor markeri moleculari.

Alte rezultate au avut la bază măsurători privind elementele de producție: greutatea știuletelui, numărul de boabe/știulete, greutatea boabelor/știulete, parametri importanți pentru planificarea activităților din următorii ani de cultură. Cumularea și corelarea acestor date cu cele identificate cu ajutorul markerilor moleculari poate contribui la alegerea variantelor alelice utile în condițiile de sol și climă în schimbare.

Au fost obținute rezultate pozitive și în ceea ce privește introgresia de gene utile în genomul porumbului prin utilizarea speciilor sălbatice înrudite cu acesta. Paniculele unor plante din populațiile 2, 3 și 4 au fost izolate cu pungi de hârtie, s-a colectat polenul și cu acesta au fost polenizate plante din liniile L9/2024 și L10/2024. Din încrucișări s-au obținut: 3 boabe L9/2024 x pop.2; 6 boabe L10/2024 x pop.2; 7 boabe L10/2024 x pop.3; 6 boabe L9/2024 x pop.4. Au fost izolate și inflorescențele unor plante din populațiile 2, 3 și 4, din autopolenizare obținându-se boabele acestor populații.



Fig 5 - Zea mays subs. mexicana cu inflorescențe izolate cu pungi (Pop 2,3,4)



Fig 6 - Boabe rezultate din X liniilor de porumb și boabe obțin. prin autofecund.



Pentru obținerea rezultatelor analizelor chimice privind conținutul în carbon în sol (continuare a activității începute în Faza 3/2024) au fost prelevate probe de sol din câmpul de Ameliorare a cerealelor (teren cultivat după grâu - proba 74-24) și Citogenetică (teren cultivat cu grâu și teren în repaus, probele 72-24 și 73-24). Rezultate obținute au arătat ca proba de sol prelevată din câmpul de Ameliorare grâu, după cultivarea cu grâu, a avut cel mai bun conținut în humus, cel mai probabil datorită perioadei de repaus dinaintea cultivării.

Tabel 1 - Conținutul în humus al probelor analizate

Cod	Identificare	Încercări efectuate												
	Profil	pH	± U*	Humus	± U*	Nt	± U*	P _{AL}	P _{AL} ^{1**}	± U*	K _{AL}	± U*	DA	± U*
		unitați pH		%		%		mg/kg			mg/kg			(g/cm3)
72-24	Proba sol 1	6,34		2,96		0,134		98	98		248		-	
73-24	Proba sol 2	6,22		2,84		0,138		75	75		236		-	
74-24	Proba sol 3	7,69		4,26		0,212		574	369		308		1,08	

Faza 4.2 - „Studiul variabilității genetice de la nivelul locusului ZmVTE4 în populații locale de porumb”

Obiectivul fazei

- Asigurarea valorii nutritive a boabelor de porumb în condițiile creșterii temperaturilor

Rezultate obținute

- Au fost caracterizate molecular 85 de genotipuri de porumb (populații locale, linii consangvinizate, linii de ameliorare și hibrizi), la nivelul locusului ZmVTE4, cu rol în acumularea tocoferolilor. Astfel, au fost efectuate două analize PCR pentru detectarea variantelor alelice favorabile pentru acumulare de α -tocoferoli în boabele de porumb. Alela favorabilă în cazul markerului INDEL118 a fost reprezentată de produsul PCR de 373pb iar cel nefavorabil de produsul de 491pb. Prezența ambilor produși evidențiază heterogenitatea /impurificarea unor materiale sau heterozigoția.

În cazul markerului INDEL7, alela favorabilă este reprezentată de produsul dimensiune de 160 pb iar alela nefavorabilă de produsul PCR cu dimensiunea de 167pb. În cazul acestui marker s-a observat un produs de aproximativ 180 pb, marcat cu “*” în populația locală Portocaliu 1. Analizele chimice ulterioare privind conținutul în tocoferoli al acestei populații vor permite o interpretare corectă a acestui rezultat.

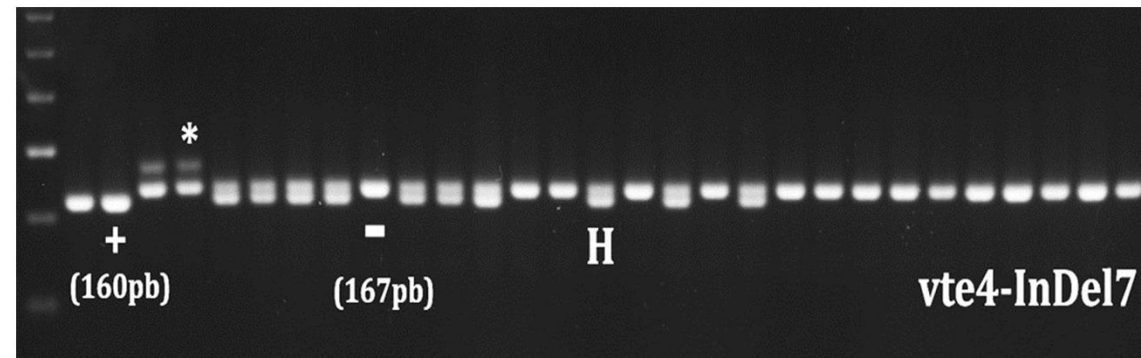


Fig.7 - Profil electroforetic cu markerul INDEL7 (“+” alela favorabilă; “-“ alela nefavorabilă, H-heterogen/heterozigot)



Screening-ul germoplasmei analizate cu markerii InDel118 și InDel7 ai *vte4* au relevat prezența alelelor favorabile atât în populații locale vechi cât și germoplasma modernă pentru ambele InDel-uri.

InDel118 a produs alele ușor de distins între materialele analizate (diferența între alele de 118 bp), comparativ cu InDel7 (diferența de dimensiune a alelei de 7 bp).

În cazul populațiilor vechi s-a remarcat populația Românesc de Studina care a prezentat ambele alele favorabile, ceea ce demonstrează că această populație nu este perfect pură, prin urmare vor fi necesare analize moleculare pe plante individuale.

Alte populații vechi au prezentat alela favorabilă pentru INDEL118 dar au fost heterozigote pentru INDEL7 (Scorumnic de Olimpești, Peretu 283, Dintele oii de Sohatu, Românesc de Butimanu și Bănățean) iar Moldovenesc de Pechea și Răzvani au prezentat doar alela favorabilă de la INDEL7.

Dintre genotipurile moderne s-au remarcat, cu ambele alele favorabile următoarele: LC403, LC406, LC508, LC740, LC802, LC811, HSF10901-19, HSF6785-20, HSF7612-20 și HSF7720-20).

Hibrizii moderni de porumb Felix, Magnus, Amurg și Miraj prezintă ambele alele favorabile dar alela favorabilă de la INDEL118 în stare heterozigotă.



Diseminare rezultate anul 2024

O parte din rezultatele Fazei 3/2024 au fost prezentate în cadrul Conferinței Internaționale “Management of Genetic Biodiversity by Plant Breeding and Sustainable Agricultural Technologies”, în lucrarea cu titlul “*Molecular analysis for detecting genetic variability at the NAM-A1 locus in a collection of wheat varieties, old populations, lines and wild species*”, lucrarea urmând să fie publicată în cursul anului 2025.

De asemenea rezultatele obținute în cadrul Fazei 4/2024 vor fi corelate cu alte rezultate și publicate sub forma unui articol în anul 2025.