



Selecția asistată de markeri ADN pentru cumulara/piramidarea de gene de rezistență la boli în linii de grâu.

Autori: Daniel Cristina, Alina-Gabriela Turcu, Cristina-Mihaela Marinciu, Gabriela Șerban, Indira Galit, Elena-Laura Conțescu, Vasile Manda, Alexandru-Leonard Dumitru, Matilda Ciucă
email: mcincda@gmail.com

Rezumat

Producția grâului este afectată negativ de o serie de boli al căror impact și răspândire sunt influențate direct de schimbările climatice. Ruginile cerealelor determinate de patogenii *Puccinia triticea*, *Puccinia striiformis f. sp. tritici* și *Puccinia graminis f. sp. tritici* precum și septorioza determinată de *Zymoseptoria tritici*/*Mycosphaerella graminicola* reprezintă principale boli ale grâului. Rezistența durabilă a grâului la boli reprezintă o componentă semnificativă pentru securitatea alimentară și un obiectiv major al amelioratorilor. Cumularea/piramidarea genelor de rezistență la boli în noi soiuri de grâu constituie principala strategie pentru îmbunătățirea rezistenței grâului la boli. În acest studiu au fost analizate 46 de linii de grâu (generația F5 și F6) cu ajutorul markerilor moleculari (ADN) în vederea selectării acelor linii de grâu în care s-a evidențiat cumulara/piramidarea a două, trei, patru sau cinci alele de rezistență la boli ale genelor: **Lr34**/Yr18//Sr57/Pm38/Ltn1/Bdv1, **Lr37**/Yr17/Sr38, **Lr46**/Yr29//Sr58/Ltn2, **Lr68**/Ltn4 și **Stb16q**. Rezultatele obținute cu ajutorul markerilor moleculari au evidențiat cumulara/piramidarea în stare homozigotă a următoarelor combinații de alele de rezistență: Lr34+Lr46 (o linie), Lr37+Lr46 (2 linii), Lr46+Lr68 (2 linii). De asemenea, au fost evidențiate combinații alelice în care au existat și alele în stare heterozigotă/heterogenă (H): Lr34(H)+Stb16q; Lr37+Lr46(H); Lr34(H)+Lr37+Lr46; Lr37(H)+Lr46+Stb16q; Lr34(H)+Lr37+Lr68(H); Lr34(H)+Lr37(H)+Lr46+Lr68 (H) și Lr34+Lr37+Lr46+Lr68(H)+Stb16q. Analize moleculare pe plante individuale din linia de grâu ce a prezentat combinația alelică Lr34+Lr37+Lr46+Lr68(H)+Stb16q au permis selectarea acestei combinații în stare homozigotă. Acest studiu dovedește valoarea strategiei de ameliorare a grâului bazată pe selecție asistată de markeri ADN, pentru accelerarea obținerii de noi soiuri de grâu rezistente la rugini și septorioză.

Introducere

Ruginile grâului (brună, galbenă și neagră) reprezintă o amenințare majoră pentru producția de grâu la nivel global, inclusiv în România. Piramidarea sau cumulara genelor de rezistență la rugini în soiuri noi de grâu reprezintă strategia principală din programele de ameliorare pentru îmbunătățirea rezistenței la rugini și a durabilității acesteia.

În general există două căi de control pentru rugina brună la grâu: chimică și genetică. Rezistența genetică este reprezentată de două clase de gene ce conferă rezistență la nivel de plantulă (ASR) și rezistență la planta adultă (APR), rezistență parțială, durabilă, caracterizată prin dezvoltarea sau creșterea mai redusă și mai lentă a patogenului, fără un răspuns necrotic (efect de tip slow rusting).

Până în prezent au fost identificate și descrise 82 de gene de rezistență la rugina brună. Dintre acestea doar unele gene prezintă efect de tip „slow rusting” sau APR, gene precum Lr34, Lr46, Lr67 și Lr68. Genele Lr34 și Lr46 prezintă și efect pleiotropic, conferind rezistență APR la rugina brună (LR), rugina galbenă (YR), rugina neagră (SR) și făinare (PM).

În cazul septoriozei (STB), până în prezent, au fost identificate și cartate 22 de gene majore de rezistență și mai multe QTL-uri. Cu toate acestea, majoritatea acestor gene au spectre înguste de specificitate față de izolatele de *Z. tritici*, în plus, mai multe cicluri sexuale ale *Z. tritici* în timpul sezonului de creștere a grâului fac ca populația de agenți patogeni să fie foarte diversă și complică gestionarea bolii. Genele Stb individuale cunoscute, cu excepția Stb19 care nu a fost testată, nu sunt în prezent eficiente împotriva populațiilor de *Z. tritici* din Europa. Prin urmare, identificarea noilor gene Stb și cumulara acestora, pentru un management durabil și eficient al STB sunt considerate a fi aspecte cheie pentru gestionarea septoriozei în ameliorarea grâului.

Gena Stb16q - localizată pe cromozomul 3DL și originară din *Ae. taushii* - a oferit un nivel ridicat de rezistență la izolatele globale atât la stadiile de plantulă, cât și la stadiu de plante adulte.

Rezistența genetică poate reduce pierderile la grâu și poate fi selectată prin utilizarea markerilor moleculari. Cu toate acestea, rezistența genetică este depășită de multe ori, după modificări ale virulenței agentului patogen (aparitia de noi rase). Acest lucru evidențiază nevoia de: (1) identificare de gene care, singure sau în combinație, furnizează rezistență cu spectru larg; (2) înțelegere a mecanismelor moleculare de acțiune a patogenilor; (3) transferul genelor ce conferă rezistență în soiuri productive sau cumulara rezistenței la boli cu elemente pentru producții mari în noi soiuri.

Obiectiv: Selecția asistată de markeri pentru verificarea introgresiei unor gene de rezistență precum Lr34, Lr37, Lr46, Lr68 și Stb16q în programul de ameliorare al grâului de la INCDA Fundulea.



Rugină brună
Sursă: <https://www.glossando.ro/product/rugina-bruna/>



Rugină galbenă
Sursă: <https://www.bghaas.com/blog/4b/yellow-rust-in-wheat>



Rugină neagră
Sursă: <https://www.ars.usda.gov/midwest-area/stpnal/cereal-disease-lab/docs/cereal-rusts/wheat-stem-rust/>



Septorioză
Sursă: <https://www.glossando.ro/product/septorioza-cerealelor/>

Material și metode

Au fost analizate 46 de linii de ameliorare, generația F5 și F6, obținute la INCDA Fundulea.

Izolarea ADN s-a realizat din 3 boabe utilizând un protocol de extracție cu tampon pe bază de SDS.

Reacțiile de amplificare ADN s-au realizat cu ajutorul a două kituri de PCR: KAPA2G Fast Multiplex Mix (Sigma-Aldrich) și DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Scientific).

În cazul amplificării ADN pentru tehnica KASP (Kompetitive allele specific PCR) s-a utilizat master mix-ul KASP-TF V4.0 2X (LGC Biosearch Technologies).

Amplificările au fost realizate în termociclurile ABI ProFlex™ 3 × 32-well PCR System și Eppendorf Mastercycler EP Gradient.

Separarea produsilor PCR și/sau a fragmentelor obținute după clivare s-a realizat pe geluri de agaroză, colorate cu bromura de etidiu și vizualizate la lumină UV cu sistemul Uvidoc HD6.

Citirea și interpretarea rezultatelor tehnicii KASP s-a realizat cu ajutorul cititorului de plăci FLUOstar Omega (BMG Labtech) și a softului KlusterCaller (LGC Biosearch Technologies).

Rezultate

În cazul genei Lr34, rezultatele au evidențiat 12 linii ce prezintă alela de rezistență, 6 în stare homozigotă și 6 în stare heterozigotă.

Rezultatele pentru gena Lr37 au evidențiat 19 linii ce prezintă alela de rezistență, 13 linii homozigote și 6 linii heterozigote.

În cazul genei Lr46, s-au evidențiat 23 de linii cu alela de rezistență, 6 linii heterozigote și 17 linii cu alela de rezistență în stare homozigotă.

Pentru gena Lr68, doar în 5 linii s-a observat prezența alelei de rezistență, 3 linii heterozigote și 2 linii homozigote.

Analizele moleculare prin tehnica KASP pentru gena Stb16q au evidențiat prezența alelei de rezistență în 3 linii.

De asemenea, rezultatele au evidențiat cumulara/piramidarea în stare homozigotă a următoarelor combinații de alele de rezistență: Lr34+Lr46 (o linie), Lr37+Lr46 (2 linii), Lr46+Lr68 (2 linii). Totodată, au fost evidențiate combinații alelice în care au existat și alele în stare heterozigotă/heterogenă (H): Lr34(H)+Stb16q; Lr37+Lr46(H); Lr34(H)+Lr37+Lr46; Lr37(H)+Lr46+Stb16q; Lr34(H)+Lr37+Lr68(H); Lr34(H)+Lr37(H)+Lr46+Lr68(H) și Lr34+Lr37+Lr46+Lr68(H)+Stb16q.

Analize moleculare efectuate ulterior pe plante individuale din linia de grâu ce a prezentat combinația alelică Lr34+Lr37+Lr46+Lr68(H)+Stb16q au permis selectarea acestei combinații în stare homozigotă după cum urmează: Lr34+Lr37+Lr46+Lr68, Lr34+Lr37+Lr46+Stb16q și Lr34+Lr37+Lr46+Lr68+Stb16q.

Selecția asistată de markeri moleculari (ADN), a genotipurilor aflate în prezent în stare heterozigotă, va facilita selecția ulterioară a unui material biologic uniform care va avea în genom mai multe gene de rezistență la boli.

Concluzii

Selecția asistată de markeri moleculari completează și accelerează procesul de obținere a noi soiuri de grâu cu rezistență la boli prin evidențierea liniilor în care s-a realizat cumulara/piramidarea alelelor de rezistență.

Acest studiu prezintă rezultate ce răspund strategiilor „Pactul Ecologic European” și de la „Fermă la Consumator” prin care se solicită reducerea consumului de pesticide.

Sursă de finanțare: Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării, Program Nucleu, Proiect PN19.25.01.01

