

Raportul Științific și Tehnic

Titlul proiectului: **„Evaluarea și exploatarea resurselor genetice ale cartofului pentru crearea de varietăți rezistente la mana cartofului”**

Partener român: INCDCSZ Brașov

Partener străin: SSA Libramont, Belgia

Durata proiectului bilateral: 2 ani și 3 luni

Obiectivele generale urmărite: crearea de varietăți de cartof rezistente la mană

Obiectivele fazei de execuție: - Inventarierea resurselor genetice disponibile

- Documentare, Înființarea colecției de resurse genetice „in vitro”

Rezumatul fazei

Mana cartofului, produsă de ciuperca *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. este cea mai păgubitoare boală a cartofului. Pierderile de producție sunt cuprinse între 28 - 67 % la soiurile sensibile și 10 - 20 % la soiurile rezistente, dacă protecția este insuficientă. Pentru a înlătura cele mai mici pierderi cauzate de mană, numărul de tratamente chimice aplicat la un soi sensibil se ridică la 13-15.

Împotriva manei cartofului se poate interveni cu maxim de eficiență printr-o combatere integrată, un complex de măsuri, în care pe primul plan se situează cultivarea de soiuri rezistente. Cultivarea de soiuri rezistente la mană asigură o constanță a producției, o reducere a costurilor, precum și o protecție a mediului prin reducerea numărului de tratamente chimice.

După mecanismul de realizare, determinismul genetic și manifestarea fenotipică, există două forme de rezistență la mană:

- ☞ rezistența diferențială sau specifică, denumită și rezistență verticală, perpendiculară, absolută, genetică, monogenică, de gene majore (oligogene) sau de plantulă;
- ☞ rezistența uniformă sau nespecifică, denumită și rezistență orizontală, generală, de câmp, de gene minore (poligene), parțială sau de plantă adultă.

Mecanismul de realizare este diferit, în funcție de forma de rezistență, astfel:

- ☞ în cazul rezistenței diferențiale, parazitul induce în plantă o reacție necrogenă de apărare, bazată pe hipersensibilitate cu formare de fitoalexine în zona de pătrundere. Celulele afectate mor după pătrunderea hifelor miceliene. Porțiunea respectivă se necrozează și împreună cu aceasta moare și agentul patogen, oprindu-se astfel extinderea bolii în plantă.

În cazul acestui tip de reacție ciuperca nu se instalează și nici nu fructifică. Rezistența este de tip absolut și acționează după legea " genă pentru genă". Datorită acestui mecanism, rezistența acționează numai împotriva anumitor rase ale agentului patogen. Este o rezistență specifică, dar instabilă. La apariția unei noi rase a agentului patogen, mecanismul genetic nu mai acționează și infecția se instalează.

- ☞ în cazul rezistenței uniforme se întârzie pătrunderea și răspândirea ciupercii în planta gazdă datorită unor însușiri morfo-anatomice a țesuturilor, însă fenomenele patologice nu se opresc.

Rezistența se manifestă prin următoarele mecanisme:

- ☞ întârzierea pătrunderii agentului patogen în țesuturile plantei;
- ☞ întârzierea răspândirii ciupercii în țesuturi;
- ☞ reducerea înmulțirii și răspândirii agentului patogen.

După cum s-a menționat, aceste mecanisme nu opresc în totalitate creșterea și răspândirea agentului patogen, dar au o acțiune generală asupra tuturor raselor de mană și conferă rezistenței o mare stabilitate.

Determinismul genetic al rezistenței diferențiale la mană este controlat monogenic sau oligogenic, de gene majore codificate gene R. S-au descoperit zece gene majore R, numerotate R_1 - R_n . La specia mexicană *Solanum demissum* Lindl. au fost identificate zece gene R (R_1 - R_{10}). La specia *Solanum stoloniferum* Schl. s-au descoperit două gene majore R (R_6 - R_{6+0}). Alți factori similari au fost identificați și la specia *Solanum verrucosum* Schl. Genele majore R segregă și se transmit conform legilor mendeliene, în funcție de substrat (diploid, tetraploid sau hexaploid).

Determinismul genetic al rezistenței uniforme la mană este controlat de un număr mare de gene minore (poligene) care acționează nespecific, cu efect egal împotriva tuturor raselor. În urma segregării, genotipurile rezistente la mană au o distribuție continuă, tipică pentru caracterele poligenice, însă în majoritatea cazurilor rezultă genotipuri transgresive, ceea ce demonstrează efectul aditiv al acestora. Unele rezultate privind segregarea genelor minore, incidența și expresivitatea rezistenței, sugerează ipoteza că în transmiterea caracterului sunt implicate și mecanisme citoplasmice. Aceasta s-a observat, în special, la segregarea obținută în urma încrucișărilor dintre genotipuri cu grade diferite de ploidie.

Descrierea stiintifica si tehnica, cu punerea in evidenta a rezultatelor fazei si gradul de realizare a obiectivelor; (se vor indica rezultatele)

Inventarierea resurselor genetice

Sursele genetice ale rezistenței la mană

Cartoful cultivat în Europa (*Solanum tuberosum* L.) necesită o sporire a variabilității genetice privind rezistența la mană. Această mărire a variabilității genetice este necesară datorită apariției continue de noi rase fiziologice ale ciupercii *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Apariția continuă de noi rase fiziologice este rezultatul adaptării ciupercii la noile condiții de viață, apărute ca urmare a încorporării în genomul cartofului a unor noi gene de rezistență, a modificării relației plantă gazdă – parazit. Crearea și selecția de genotipuri rezistente la mană, reprezintă un proces continuu și complicat, care necesită un volum mare de lucrări eșalonate în timp. Cu toate acestea, noile genotipuri rezistente la mană sunt vulnerabile în fața atacului unor noi rase fiziologice ale agentului patogen.

La cartof sursele de rezistență la mană sunt reprezentate de:

- ☞ specii sălbatice și forme primitive din centrele de origine;
- ☞ soiuri și linii de ameliorare, ale cartofului cultivat;
- ☞ hibrizi interspecifici cu însușiri speciale;
- ☞ forme dihaploide și mutante ale soiurilor cultivate.

Utilizarea speciilor genului tuberifer *Solanum* L. ca sursă de rezistență la mană

Variabilitatea genetică a genului tuberifer *Solanum* L. este foarte mare. După ultimele încadrări taxonomice, genul *Solanum* L., subgenul *Potatoe* (Dun.) Arcy., secția *Petota* Dun., cuprinde peste 340 de specii grupate în 21 de serii. Cele mai populate serii sunt: *Tuberosa* (Rydb.) Hawk. (142 de specii), *Conicibaccata* (40 de specii), *Commersoniana* (38 de specii), *Longipedicellata* Buk. (22 de specii), *Piurana* Hawk. (18 specii), *Megistacroloba* Card. Hawk. (15 specii) și *Demissa* Buk. (14 specii). Variabilitatea genetică este mult amplificată de existența unui șir de ploidie de la 2x la 6x (tabelul 1.)

TAXONOMIA SPECIILOR DE CARTOF

GENUL: SOLANUM L.

SUBGENUL: POTATOE (G. Dun.) Arcy.

SECȚIA: PETOTA Dun.

Tabelul 1

SERIA	SPECII PE GRADE DE PLOIDIE							
	2x	3x	4x	5x	6x	?x	NR.	%
SUBSECȚIA: ESTOLONIFERA HAWK.								
ETUBEROSA Juz.	8		2				10	2,9
JUGLANDIFOLIA (Rydb.) Hawk.	6						6	1,7
SUBSECȚIA: POTATOE G. Dun.			SUPERSERIA: STELLATA Hawk.					
MORELIFORMIA Hawk.	1						1	0,3
BULBOCASTANA (Rydb.) Hawk.	3						3	0,8
PINNATISECTA (Rydb.) Hawk.	15						15	4,3
POLYADENIA Buk. et Corr.	2						2	0,6
COMMERSONIANA Buk.	38						38	10,9
CIRCAEIFOLIA Hawk.	3						3	0,8
LIGNICAULIA Hawk.	1						1	0,3
OLMOSIANA Och.	1						1	0,3
JUNGASENSA Corr.	9						9	2,6
SUPERSERIA: ROTATA Hawk.								
MEGISTACROLOBA Card. Hawk.	14	1					15	4,3
CUNEOLATA Hawk.	6						6	1,7
CONICIBACCATA Bitt.	30		9		1		40	11,9
PIURANA Hawk.	6		1			11	18	5,2
INGIFOLIA Och.						2	2	0,6
MAGLIA Bitt.	1						1	0,3
TUBEROSA (Rydb.) Hawk. W.	96						96	27,7
K.	16		2	11	1	6	36	10,4
ACAULIA Juz.			6		1		7	2,0
LONGIPEDICELLATA Buk.	2		19			1	22	6,4
DEMISSA Buk.	1			2	9	2	14	4,0
TOTAL	259	1	39	13	12	22	346	

Numărul mare de specii diploide (peste 75%), din tabelul speciilor genului tuberifer *Solanum L.*, repartizate în aproape toate seriile, pledează pentru introducerea unor scheme privind ameliorarea rezistenței la mană, în care combinarea, recombinarea, analiza genetică și selecția caracterelor să se efectueze pe treapta diploidă.

Arealul speciilor cu rezistență la mană, din centrele de origine a cartofului este destul de vast, dar poate fi localizat în două mari arii geografice (tabelul 2)

DISTRIBUȚIA GEOGRAFICĂ ȘI TAXONOMICĂ A GENELOR DE REZISTENȚĂ LA MANĂ ÎN SPECIILE TUBERIFERE ALE GENULUI SOLANUM L.

Tabelul 2

*SERII	Bul.	Pin.	Con.	Piu.	Dem.	Lon.	Pol.	Tub-w
ZONA								
MEXICO	blb.	bst.cph.	Agf.		dms.grr.	hir.	pld.	
GUATEMALA	clr.	ehr.trf. lac.smb.	Axc.		hou.iop.s em.vrn.	pot. sto.	les.	
COLUMBIA			col.					adr.
PERU		.		chm. hcb. pur.				chq.

* - prescurtări după Simmonds (1962)

- 1) Văile umede din Mexic, Guatemala, Nicaragua și Costa Rica. În acest areal sunt răspândite specii din seriile Demissa, Longipedicellata, Pinnatisecta, Bulbocastana, Conicibaccata și Polyadenia;
- 2) Pădurile cețoase din Bolivia și Peru, unde se întâlnesc specii din seriile Tuberosa și Megistacroloba.

Utilizarea soiurilor de cartof ca sursă de rezistență

Drept genitori în lucrările de ameliorare, s-au utilizat soiuri de cartof posesoare a unor gene R, precum și a unui bogat arsenal de gene minore.

Sursa genelor R este specia mexicană hexaploidă *Solanum demissum* Lindl. Printre acestea pot fi amintite:

- ☞ R₁ – Amyla, Apta, Aquilla, Drossel, Gloria, Kameratz, Nova;
- ☞ R₂ – Veselowskii;
- ☞ R₃ – Delos, Patrones, Pentland, Ace;
- ☞ R₄ – Delfin, Isola;
- ☞ R₁R₃ – Anco, Reaal, Remona, Susana, Wulkan;
- ☞ R₁R₄ – Olew, Virginia;
- ☞ R₂R₄ – Krasnoufinski;
- ☞ R₃R₄ – Epoka, Lawa, Uralskii, Vertifolia.

Dintre soiurile de cartof fără gena R, dar cu un cortegiu de gene minore, care conferă o rezistență uniformă, pot fi menționate: Doritta, Bertitta, Konkitta, Elenitta, Adzimba.

Utilizarea hibrizilor de ameliorare cu însușiri speciale

Prin încrucișări repetate ale cartofului cultivat (*Solanum tuberosum* L.) cu diferite specii, s-au obținut hibrizi de ameliorare cu însușiri speciale, în ale căror genotipuri se găsesc diferite combinații ale genelor R, inclusiv R₁, R₂, R₃, R₄. Aceștia se utilizează cu precădere în lucrările de ameliorare a rezistenței la mană.

Formele dihaploide se utilizează în special pentru identificarea genelor de rezistență, întrucât acestea sunt practic sondaje de gameți a formelor tetraploide din care provin. De asemenea, rezistența la mană poate fi indusă și prin mutageneză, caz în care are loc modificarea structurii genetice a unui genotip, prin tratarea acestuia cu diferiți agenți mutageni..

În genomul speciei cultivate (*Solanum tuberosum* L.) nu au fost identificate genele R, care conferă rezistență la mană. Pentru a ameliora acest caracter este necesar transferul acestor gene, din vastul rezervor al speciilor sălbatice care aparțin genului tuberifer *Solanum* L.

Resurse genetice identificate

Aceste gene rezistente au fost identificate în solanacee sălbatice din care *Solanum demissum* este cel mai bine reprezentant pentru aceste caracteristici. Au fost identificate 11 gene majore, deși poate sigur există și altele. După introducerea acestor gene în varietățile comerciale, s-a constatat destul de repede că ciuperca era capabilă să rupă aceste rezistențe și să infecteze din păcate toate plantele. Aceste sușe noi de ciupercă (denumite rase fiziologice sau virulente R₁, R₂...) sunt capabile să infecteze varietățile respective purtătoare a genelor majore de rezistență, R₁, R₂... Este același principiu de funcționare ca la rezistența numită verticală, susceptibilă de a se rupe rapid imediat ce o rasă fiziologică capabilă de atac este selecționată de către mediul înconjurător. Astăzi se preferă aceste rezistențe verticale, rezistența orizontală sau rezistența în câmp controlată în manieră poligenică prin diferite gene minore care individual nu dau nici o rezistență dar printr-o colegială în sânul unei plante permit manifestarea bolii, făcând planat mai tolerantă la infecții. Ceea ce știm este că aceste gene minore sunt astăzi utilizate pentru caracterizarea populațiilor de mană într-un mediu dat. Profilul virulenței izolatelor este determinat prin testarea relațiilor de compatibilitate patogen (izolat)-gazdă (plantă) pe o colecție de 11 clone, fiecare având o genă majoră determinată. Clonele sunt cultivate în seră în condiții controlate, pentru a se obține foliole pe care se realizează testele în laborator prin picurarea unei picături care conține o suspensie a izolatului ce se testează și plasând foliolele astfel tratate în

incubator, 18°C, fotoperioadă 16 ore. Citirea reacției se face o săptămână mai târziu. Profilul virulenței izolatelor testate sunt prezentate în tabelul următor. Se constată că izolatele cu un profil de virulență complex, adică cele care pot rupe 5 gene de rezistență dintr-o dată sunt cele mai numeroase. Profilul de virulență cel mai comun este 1.3.4.7.10.11. Gena majoră de rezistență care nu este ruptă niciodată este R9, în timp ce genele R2, R5, R6 și R8 sunt rupte mai rar de populația de mană prezentă în regiunea Vallonie.

Genele majore de rezistență identificate de SSA Libramont Belgia ce vor fi utilizate în hibridări la INCDCSZ Brașov în anul 2009, sunt prezentate în tabelul 3.

Table nr.3

Genele rezistente	Clona	Sursa
R5	3053-18	S.demissum din Canada
R6	XD2-21	S.demissum din Canada
R7	218ef(7)	S.Phureja X S.demissum
R8	2424a(5)	S.Phureja X S.demissum
R9	2573(2)	S.demissum X soiul Alness
R10	3681ad(1)	S.demissum derivate din clone testate în Mexic
R11	5008ab(6)	S.demissum derivate din clone testate în Mexic
R0	Craigs Royal	Craigs DefianceX Gladstone

Possibilități de valorificare economică a rezultatelor obținute

Noile varietăți obținute în colaborare cu partenerul valon vor permite producerea de sămânță de calitate, competitivă pe plan internațional generând profituri suplimentare producătorilor de sămânță din România.

Raport de înființare culturi “in vitro” resurse genetice

Genotipurile identificate în prima etapă a fi valorose din punct de vedere al rezistenței la mană (prezentate în tabelul nr.3), au fost introduse în colecția “in vitro” în laboratorul de culturi de țesuturi din cadrul institutului nostru.

Protocolul de înființare a colecției “in vitro” presupune parcurgerea a câtorva etape foarte importante pentru menținerea resurselor genetice în colecție:

- 📄 Minibutășirea plantulelor libere de boli (Fig. 1)



Fig.1

- Inocularea pe medii de creștere MS (Murashige-Skoog) cu adaus de auxină pentru dezvoltarea și înrădăcinarea plantulelor (Fig.2)

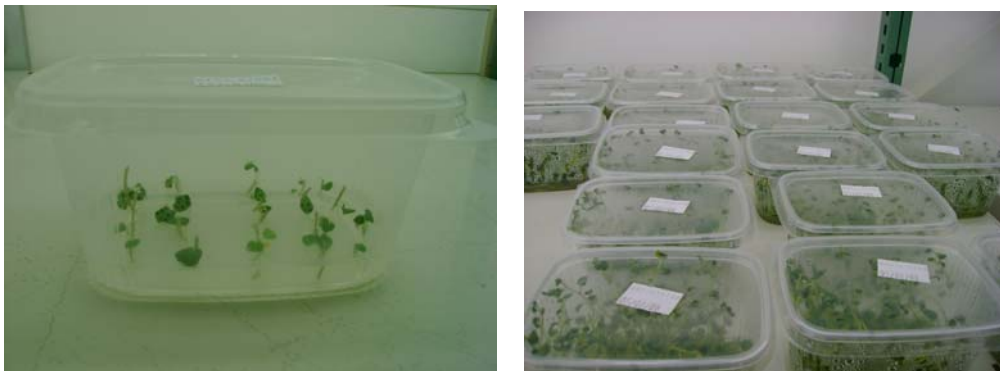


Fig.2

- 📄 Multiplicarea plantulelor pe diferite medii de conservare cu adaus de manitol (Fif.3)(tab. 4).



Fig.3

Fig.3

Tabel nr. 4 Variantele de medium

Variante	Mediul
M₀ (control)	MS
M₁	MS+Manytol 1.5%
M₂	MS+Manytol 4 %
M₃	MS+Manytol 7 %
M₄	MS+Manytol 10%

Pentru fiecare variantă de mediu au fost inoculați 40 minibutași/genotip R .După inoculare, minibutașii au fost introduse în camera de creștere cu o fotoperioadă de 16 ore lumină, 3000-6000 luxs, 8 ore întuneric și o temperatură de 20-22⁰C.



Fig.4

Pentru fiecare genotip în parte se întocmește o fișă de evidență a materialului introdus in vitro conform Anexei A și B.

FIȘĂ DE PRODUCERE ȘI OBSERVARE A MATERIALULUI *IN VITRO*

Soiul:

Originea materialului:

Punerea în cultură

Test ELISA	Data	Nr.
sub.1		

Rezultate test ELISA	Data	Nr.
sub.3		
sub.4		
sub.5		
sub.6		
sub.7		
sub.8		

Subculturi:

sub.3		
sub.4		
sub.5		
sub.6		
sub.7		
sub.8		

Transfer în seră	Data	Nr.

Control serologic în seră	Data	Nr.

Recoltat minituberculi în seră	Data	Nr.

RAPORT TEST ELISA

Tipul materialului: Plantule

Data recepției:

Data testării:

Soiul:

Eșantion: 1

Metoda: Test ELISA

Rezultate

PLRV: 0

PVY: 0

PVS: 0

PVX: 0

PVA: 0

PVM: 0

Semnătura șefului de compartiment

Semnătura responsabilului de raport

Rezultate obținute

Pentru conservarea in vitro a genitorilor rezistenți la mană a fost utilizat mediul de cultură MS cu diferite cantități de manitol. Pentru fiecare genitor cu rezistență la mană R0, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 au fost inoculați 40 minibutași pe cele 5 medii de conservare și câte 100 pe mediul MS fără manitol(Tabel 5)

Plantulele de pe mediul MS cu adaus de auxină vor fi multiplicare și vor fi folosite în procesul de hibridare ce va începe în anul 2009.

Nr. Plantule inoculate in vitro Tabel nr. 5

Genele rezistente	Clona	M0 control	M1+Manitol 1,5%	M2+Manitol 4%	M3+Manitol 7%	M4+Manitol 10%	MS+auxină
R5	3053-18	40	40	40	40	40	100
R6	XD2-21	40	40	40	40	40	100
R7	218ef(7)	40	40	40	40	40	100
R8	2424a(5)	40	40	40	40	40	100
R9	2573(2)	40	40	40	40	40	100
R10	3681ad(1)	40	40	40	40	40	100
R11	5008ab(6)	40	40	40	40	40	100
R0	Craigs Royal	40	40	40	40	40	100

Concluzii

Selecția varietăților rezistente la mană și multiplicarea lor în exclusivitate de către producătorii de plante va ameliora într-un mod semnificativ veniturile atrase de această activitate. Propunerea de noi varietăți de cartof pentru producție participă la menținerea unei activități agricole competitive și dinamice

Bibliografie

1. Nicoleta Chiru, Roxana Roșu, Ghe. Pamfil, Andreea Tican ,*Researchers concerning potato in vitro conservation. partial results, 2007, Anale SNBC*
2. Badea Elena Marcela, Săndulescu Daniela, *Conservarea celulelor, țesuturilor și organelor vegetale. In: Biotehnologii vegetale, 2001, 130-134.*
3. Cachiță-Cosma Dorina., Halmagy Adela., Cristea Victoria, *Conservarea germoplasmei „in vitro”*: Lucrările reunite ale celui de al VII-lea și al VIII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale: Culturi „in vitro” la cormofite, Arad 1997 și Buziaș 1998, 54-63.
4. Cachiță-Cosma Dorina., Sand Camelia, carte, *Biotehnologie vegetală, vol. i, Bazele teoretice și practice*, Sibiu 2000.
5. Hezky L.E., Nagy M., *In vitro conservation of potato germoplasm in Hungary*. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.3: Potato, 1987, 441-452.*
6. Halmagy Adela, Cachiță Cosma-Dorina, Deliu C., *Conservarea garoafelor „in vitro”*. In. Al XII-lea Simpozion de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, iunie 2003. Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură, 136-142.
7. Mabanza J., Otabo F.R., Moussouami C., *Conservation in vitro du germoplasme de cultivars africains de manioc* (Manihot esculenta Crantz). PGR Newsletter-FAO-Biodiversity, 2000, 29-32