

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: -

Activitate II.1

Semănatul semințelor și recoltatul primelor forme parentale

Activitate II.2

Multiplicarea și evaluarea în câmp

Activitate II.3

Evaluarea în laborator a formelor parentale obținute

Denumirea Evenimentelor Organizate:

Activitate B1

Workshop

Activități prevăzute în programul de cercetare al tânărului cercetător angajat:

Activitate III.1

Menținerea colecției de germoplasmă „in vitro”, Multiplicarea resurselor genetice

Rezumatul fazei



Un soi nou de cartof reprezintă descendența vegetativă a unei singure plante, deci o clonă. Toate plantele unei astfel de clone sunt perfect egale.

Cu cât o plantă de cultură are o importanță economică mai mare și o diversitate mai mare în utilizare, cu atât are nevoie în lucrările de ameliorare de o variabilitate mai mare. Cartoful se numără printre plantele care necesită în mod deosebit mărirea variabilității genetice din următoarele motive:

- are o destinație de utilizare foarte diferită: consum în stare proaspătă (timpuriu, vară, toamnă-iarnă), industrie (spirt, amidon, dextrina, dextroza, clei, cauciuc, etc.) industrializare (pommes frites, chips, filgi, etc.), furajare, etc.;

- cartoful a fost adus în Europa sub forma unui număr mic de tuberculi, care au fost înmulțiți vegetativ astfel încât timp de peste 300 de ani a fost lipsit de schimbul de gene cu formele primitive și salbatice din leagănul său de origine.

Indiferent de modul de utilizare al unui soi, în crearea acestuia amelioratorul are în vedere o producție ridicată și o calitate foarte bună. În plus în obiectivele de

ameliorare tot mai mult se pune accentul pe **rezistența la boli** și dăunatori, rezistența la condițiile de stres hidric și termic, rezistența la vătămări mecanice și o capacitate corespunzătoare de păstrare.

În procesul de ameliorare al cartofului realizarea de combinații hibride între anumiți genitori cunoscuți are o importanță deosebită. De succesul acestei faze, procesul de ameliorare depinde, ulterior, posibilitatea selecționării a unor soiuri valoroase, potrivit obiectivelor propuse. Planificarea și obținerea combinațiilor hibride este deosebit de importantă pentru a realiza o variabilitate genetică între care să se identifice genotipuri valoroase care să poată fi testate și verificate în continuare în procesul de obținere a unui soi.

La începutul lucrărilor de ameliorare a cartofului, selecția soiurilor se efectua dintr-un număr restrâns de genotipuri a unei populații, întrucât soiuri superioare celor existente se depistau cu ușurință. Odată cu apariția unor noi boli și dăunatori a cartofului, precum și necesității creării de soiuri specializate, pe grupe de folosință, este necesar ca selecția unui **nou** soi să se efectueze dintr-un număr foarte mare de genotipuri.

Cresterea presiunii de selecție în ultima perioadă, de la 25-33% la 4-7% s-a impus datorită transferării unor caractere de la speciile sălbatice (în special caracterele de rezistență la boli, care nu se regăsesc în genotipul cartofului cultivat, Solanum tuberosum L), alături de care se transmit și o sumedenie de caractere nedorite.

Pe plan mondial crearea de variabilitate genetică în scopul identificării de noi soiuri este un obiectiv de bază. Astfel în Olanda se produc anual circa 2 milioane de noi genotipuri, iar în Polonia circa 3,5 milioane.

Realizarea variabilității este o activitate științifică bazată pe studii de genetică. Aceasta îmbină cercetările de genetică și ameliorare fiind o punte între știința și practica. Identificarea de soiuri în populații hibride este și va rămâne o parghie importantă în crearea de noi soiuri. De altfel majoritatea soiurilor din sortimentul mondial au fost create pe această cale cu excepția unora (foarte puține raportate la numărul de soiuri cunoscute) care au fost create prin metodele ingineriei genetice.

Evaluarea și selecția celor mai bune clone în încrucișările obținute de Institutul nostru este o realizare de lungă durată. Ultimul obiectiv este selecționarea din mii de clone obținute din semințe. În acest caz, se intervine în selecționarea clonelor cu rezistență la mană. Totuși, această caracteristică trebuie prin urmare să fie însoțită de alte calități indispensabile pentru a putea spera de acceptarea unui soi nou față de consumator și/sau de filiera de distribuție:

randament, prezentare, calități de utilizare sunt criteriile necesare pentru a lua în calcul toată lungimea procesului de selecție.

Descrierea științifică și tehnică, cu punerea în evidență a rezultatelor fazei și gradul de realizare a obiectivelor; (se vor indica rezultatele)

Semănatul semințelor și recoltatul primelor forme parentale

Metoda de obținere a genotipurilor hibride.

Pentru obținerea genotipurilor hibride s-a utilizat ca metodă hibridarea sexuată.

Hibridarea sexuată propriu – zisă cuprinde următoarele etape:

a) Alegerea genitorilor

Alegerea genitorilor s-a realizat pe baza expresiei fenotipice și a modului de transmitere a caracterelor luate în studiu. În acest scop s-au efectuat hibridări test pentru verificarea valorii combinațiilor hibride. Toate acestea au loc în teren protejat, seră sau solar, în cazul nostru solar (fig.1).



Fig. 1. Sera înflorită (original)

b) Pregătirea inflorescențelor pentru lucru

Florile speciilor de cartof sunt hermafrodite, cu organele masculine și feminine bine dezvoltate și evidente. Structura florii permite atât autofecundarea cât și polenizarea liberă. Este întâlnit destul de des fenomenul de protoginie.

Protoginia, corelată cu lungimea pistilului și posibilitatea unei polenizări entomofile sau anemofile, măresc procentul fecundărilor străine. Autofecundarea este favorizată de aplecarea florii în jos, atunci când aceasta se închide și este frecventă la formele cu pistilul mai scurt.

Pentru încrucișarea formelor normal fertile a fost necesară castrarea florilor (fig. 2).



Fig.2. Castrarea florilor (original)

Operațiunea a constat în înlăturarea staminelor (androceul) de la genitorul matern. Înainte de castrare s-au înlăturat bobocii mici neînfloriți, precum și florile deschise, lăsându-se câte 3 - 5 boboci bine formați în fiecare inflorescență. Bobocii s-au ales cu mare atenție, avându-se în vedere ca cei doi pori din vârful fiecărei stamine să fie bine închiși. Apoi s-a prins câte un boboc între degetele mâinii stângi și s-au înlăturat cele cinci stamine, cu ajutorul unei pensete, spatule sau a altui obiect cu vârf.

Când genitorul matern a fost steril din punct de vedere mascul, lucrarea de castrare nu a fost necesară.

c) Polenizarea

Polenizarea s-a efectuat la 24 de ore (a doua zi) după castrare, timp în care stigmatul s-a maturat și a devenit receptiv. Polenizarea s-a efectuat cu ajutorul unui tub de sticlă cu diametrul de 3 – 5 mm, plin cu polen, în care s-a introdus stigmatul.

Pentru a se asigura fecundarea, polenizarea s-a repetat la 24 și 48 de ore (fig.3).



Fig.3. Polenizarea (original)

Întrucât polenizările s-au efectuat pe lăstari detașați, în spații închise, fără curenți de aer și care nu permiteau pătrunderea insectelor, nu s-a realizat izolarea florilor castrate și polenizate.

În cazul hibridărilor pe lăstari detașați, după alegerea genitorilor s-au efectuat în plus următoarele lucrări:

- Recoltarea lăstarilor – s-a făcut prin detașarea de pe plantă a lăstarilor a căror inflorescențe au fost dezvoltate corespunzător, din faza de boboc până în faza de flori deschise. Lungimea lăstarilor a fost de cca. 20-25 cm.

- Toaleta lăstarilor – s-a făcut imediat după recoltarea lor și a constat în îndepărtarea frunzelor bazale, îmbătrânite sau bolnave, a bobocilor prea mici și a florilor deschise.

Lăstarii toaletați s-au așezat în sticle cu apă, în care s-a introdus o soluție nutritivă și o substanță bactericidă, de regulă un antibiotic. Ei au vegetat în aceste condiții, până la formarea și maturarea bachelor.

Pentru polenizare s-a folosit polen proaspăt sau polen conservat.

Pentru recoltarea polenului s-au colectat flori deschise de la partenerul mascul, care au fost păstrate timp de 24 de ore într-o cameră închisă, fără curenți de aer, ca polenul să se usuce pentru a putea fi extras într-o cantitate cât mai mare. După 24 de ore (a doua zi) polenul a fost recoltat prin scuturare cu ajutorul unei lame vibratoare (fig.4) și introdus în tuburi de sticlă cu diametrul de 3 – 5 mm, care au fost închise la capete cu tamponare de vată. Cu ajutorul tuburilor respective, pline cu polen, s-a efectuat polenizarea, prin introducerea pistilelor în tuburi și tamponarea acestora cu masa de polen.



Fig.4. Scuturător de polen

Când nu a existat polen proaspăt s-a folosit cu succes polen conservat. Conservarea polenului s-a efectuat în special la genitorii cu însușiri speciale care produc polen în cantități reduse sau au perioade diferite de înflorire față de partener.

Avantajele folosirii polenului conservat au fost următoarele:

- ◆ Posibilitatea folosirii lui continue în hibridare;

- ◆ Păstrarea unui număr mare de structuri genetice într-un spațiu redus;
- ◆ Posibilitatea schimbului de germoplasmă la distanțe mari;
- ◆ Posibilitatea folosirii polenului în androgeneză;
- ◆ Spațiu redus pentru depozitare;
- ◆ Hibridarea între parteneri cu perioade diferite de înflorire.

Polenul utilizat a fost conservat prin uscare în exicator și păstrat în frigider la 4⁰ C. Durata de păstrare a polenului, utilizând această metodă a fost de 1 an. Polenul utilizat, mai vechi de 1 an, a fost conservat în vid, în fiole de sticlă și păstrat la – 20⁰C. Durata de păstrare a acestui polen a fost mai lungă, de regulă 2 – 3 ani.

Cercetările efectuate au arătat o modificare a viabilității polenului în funcție de metoda și timpul de păstrare.

Pentru prelungirea perioadei de păstrare s-a utilizat liofilizarea în azot lichid. Indiferent dacă s-a folosit polen proaspăt sau polen conservat, înainte de folosire s-a determinat fertilitatea acestuia.

Dacă fecundarea a avut loc se va forma fructul, baka. Aceasta înainte de a ajunge la perioada de maturitate v-a fi legată cu tifon pentru a nu se desprinde de lăstar (fig. 5).



Fig.5. Formarea bachelor

Cand au ajuns la maturitate acestea se recoltează și se pun la maturat în laborator (fig.6.), după care se scot semințele cu ajutorul unui **blender** (Fig.7).



Fig.6. Uscarea bachelor



Fig. 7. Etapele separării semințelor

Semințele separate de pulpa bachelor se spală foarte bine, se pun la uscat (Fig.8), se depozitează apoi în pungulițe de hârtie, pe etichetă fiind trecuți părinții (soiurile) și anul de formare. În primăvară sunt făcute însămânțări în ghivece individuale, plantele formându-se în condiții de seră unde au loc toate testele (rezistența la mană, la virusuri X, Y, etc.).



Fig.8. Uscarea semințelor

Rezultate

În primăvară au fost plantate următoarele combinații:

Tabel 1

Nr. crt.	Combinația	Anul de plantare	Progresia în timpul de selecție (numărul de clone selecționate)					
			Nr. semințe An 0	An 1	An 2	An 3	An 4	An 5
1	Gasore x Eden	2009	140					
2	Exquisa x Eden	2009	135					
3	Exquisa x Apolline	2009	130					
4	R2 x Dalida	2009	50					
5	R3 x Apolline	2009	80					
7	R3 x Dalida	2009	100					

Tabel nr.2 Lista încrucișărilor realizate la Brașov în 2009

Nr.crt.	Încrucișarea realizată			Nr. semințe obținute
1	SARPO-MIRA	X	FRIBEL	450
2	SARPO-MIRA	X	PAMELA	2000
3	SPUNTA	X	APOLLINE	500
4	EXQUISA	X	97-F-267-10	300
5	EXQUISA	X	FRIBEL	800
6	SOLARA	X	FRIBEL	750
7	SOLARA	X	97-F-267-10	400
8	SOLARA	X	ORCHESTRA	250
9	R1-99-SASA	X	97-F-267-10	2000
10	R1-99-SASA	X	CMK-1999-018-010	50
11	R1-99-SASA	X	RUSTIC	200
12	R1-99-SASA	X	FRIBEL	1500
13	R2-99-SASA	X	CMK-1999-018-010	150
14	R3-99-SASA	X	EDEN	1000
15	R3-99-SASA	X	97-F-267-10	300
16	R3-99-SASA	X	RUSTIC	300
17	R3-99-SASA	X	PAMELA	200
18	R3-99-SASA	X	OCEANIA	150
19	R5-99-SASA	X	ORCHESTRA	200

20	R6-99-SASA	X	EDEN	50
21	R6-99-SASA	X	ORCHESTRA	900
22	R7-99-SASA	X	ORCHESTRA	3000
23	R8-99-SASA	X	FRIBEL	600
24	R8-99-SASA	X	APOLLINE	100
25	EDEN	X	RUSTIC	50
	TOTAL SEMINȚE OBȚINUTE			16800

Au fost realizate 25 de combinații obținându-se 16.800 semințe, combinații care vor fi plantate în seră atât de partenerul valon cât și de partenerul român.

În data de 9 Decembrie 2009 la INCDCSZ Brașov a fost organizată Sesiunea de comunicări științifice cu care ocazie a fost invitat partenerul nostru din Belgia (www.potato.ro) unde a fost prezentată comunicarea științifică „Breeding for resistant to late blight potato varieties” iar din parte noastră lucrarea „Selecția clonală în urma hibridărilor cu genitori din Belgia”. În urma discuțiilor avute pe seama celor 2 lucrări, dar și a colaborărilor avute până în prezent, s-a remarcat faptul că partenerul belgian este foarte hotărât să continue colaborarea cu noi în domeniul creerii de soiuri și după terminarea contractului belgian româno-vallonă.

Bibliografie

1. Bachofen B., et Maurer J., 2000. Strategie pour la mise sur pied d une reseau national de vergers conservatoires, OFAG, Berne.
2. Ballvora A, Ercolano MR, Weiss J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C., 2002, The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 2002 May;30(3):361-71.
3. Bradshaw, J.E., 2008, Breeding for field resistance to late blight of potato at SCRI, ISHS Acta Horticulturae 834: III International Late Blight Conference
4. Bradshaw, J.E., Bryan, G.J., Lees, A.K., McLean, K. and Solomon-Blackburn, R.M. 2006. Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) R-gene differentials of Black. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 744 - 751.

5. Bradshaw, J.E., Pande, B., Bryan, G.J., Hackett, C.A., McLean, K., Stewart, H.E. and Waugh, R. 2004. Interval mapping of quantitative trait loci for resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], height and maturity in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Genetics* 168, 983 - 995.
6. Cachiță-Cosma Dorina., Sand Camelia, carte, *Biotehnologie vegetală, vol. i, Bazele teoretice și practice*, Sibiu 2000.
7. Debabrata S., & Prakash S.N., 1998, “ Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102: 275-280.
8. Derron M., Kleijer G., Corbay R., und Schmid J.E., 1993. Plantes cultivees: Ressources genetiques en Suisse. *Revue Suisse Viti Arbori et Horti*, 25: 105-120.
9. Escobar, R., Mafla, G., et Roca W., 1995, „Cryopreservation for long term conservation of cassava genetic resources. The cassava Biotechnology Network.190-193.
10. Khalid F., Masud Mahmood M, Duri Iman Khan Raham Sher, and Asif-ur-Rehman Khan – “Evaluation of CIP Potato Germplasm for Late Blight Resistance During Summer Season in Sharan, Kaghan Valley”, *Asian Journal of Plant Sciences*, Volume 1 Number 2: 195-196, 2002;
11. Lê C. L., Thomas D., Nowbuth L., 2002.Conservation des pommes de terre *in vitro* et caracterisation des varietes cultivees en Suisse. *Revue Suisse Agric.*, 34 (133-136).
12. Le et al. 2003: Bioencapsulation: production et conservation de semances de pomme de terre miniaturisees *in vitro*. *Revue Suisse Agric.*, 35: 199-203.
13. 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
14. Mulema, J. MKAdipala, E.Olanya, OMWagoire, W., 2008. *Yield stability analysis of late blight resistant potato selections.*, *Experimental Agriculture.*, 2008Vol.44(No.2)
15. Nakitandwe J., Adipala E., EL-Bedewyi R. , Agoire W. W, and Lemaga B., “Resistance to late blight and yield of population B3 potato selections in Uganda”, *African Crop Science Journal*, Vol. 13. No. 2, pp. 95-105;
16. Nicoleta Chiru, Roxana Roșu, Ghe. Pamfil, Andreea Tican ,*Researchers concerning potato in vitro conservation. partial results, 2007, Anale SNBC*
17. Quintanilla P., and Brishammar S. , 1998, Systemic induced resistance to late blight in potato by treatment with salicylic acid and *Phytophthora cryptogea*, *Potato Research*, Volume 41, Number 2 / June, 1998, 135-142.

18. Singh Ram J. - "Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement", "Vegetable Crop". Volume 3, 2006, pp17-59;
19. Solomon-Blackburn, R.M., Stewart, H.E. and Bradshaw, J.E. 2007. Distinguishing major-gene from field resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) and selecting for high levels of field resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 115, 141 - 149.
20. Stewart, H.E., Bradshaw, J.E. and Pande, B. 2003. The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology* 52, 193 - 198.
21. Zarb J., Ghorbani R., Juntharathap P., Shotton P., Santos J., Wilcockson S., Leifert C., Litterick A.M., Ruairidh a Bain, Wolfe M. – "Control strategies for late blight in organic potato production", *UK Organic Research 2002: Proceedings of the COR Conference*, 26-28th March 2002, Aberystwyth, pp. 221-222.